



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Aplicação de antígeno larvar de *Toxocara canis* no
imunodiagnóstico da toxocarose humana

CRISTIANA FILIPA COSTA PEIXOTO

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA

Abril, 2018



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Aplicação de antígeno larvar de *Toxocara canis* no
imunodiagnóstico da toxocarose humana

Autor: Cristiana Filipa Costa Peixoto

Orientador: Professora Doutora Silvana Belo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Parasitologia Médica

Agradecimentos

Manifesto os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Doutora Sivana Belo, pelos ensinamentos, confiança e compreensão. O seu apoio e disponibilidade na orientação e planificação deste trabalho, bem como toda ajuda com o tratamento estatístico dos dados, tornaram este objetivo concretizável.

Ao Doutor Pedro Ferreira e à Técnica Especialista Isabel Clemente pelo apoio e ajuda disponibilizada na execução das técnicas laboratoriais.

Aos médicos veterinários do Canil Municipal de Lisboa, Dra. Marta Videira, e do Canil Municipal de Almada, Dr. Miguel Almeida, pela colaboração no processo de recolha dos parasitas adultos.

Às minhas colegas e companheiras de Mestrado, Catarina Monteiro, Cláudia Valente e Inês Santos, pela alegria, boa disposição e momentos maravilhosos.

À coordenadora do laboratório de Microbiologia Clínica do CHLO, Dra. Isabel Paes de Faria, pelo carinho e compreensão.

E por último, aos Meus.

Aos meus Pais, não só por tornarem possível a realização deste objetivo, mas também pela força, energia e apoio incondicional transmitidos.

Ao Rui e Isabel, pelas palavras de incentivo.

Ao José, pela presença constante na minha vida, pela paciência e ajuda preciosa na formatação deste trabalho.

Resumo

A toxocarose humana é uma zoonose helmíntica de distribuição mundial, causada pela infecção de larvas no segundo estágio (L2) de *Toxocara* spp. e outros nemátodes da ordem Ascaridida, podendo desencadear, entre várias síndromes clínicas, a toxocarose visceral ou larva migrante visceral (LMV). O Homem, hospedeiro paraténico destes nemátodes, não elimina qualquer forma parasitária, tornando o diagnóstico desta zoonose dependente de uma combinação de sintomas suportados por uma serologia positiva e história epidemiológica.

O método de referência no imunodiagnóstico da toxocarose baseia-se no uso de kits comerciais de micro-ELISA, que utilizam antígenos de excreção/secreção de larvas L2 de *T. canis* (Ag E/S) na deteção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. no soro humano. Embora de elevada sensibilidade, este método apresenta como desvantagens a ocorrência de reações cruzadas com anticorpos induzidos por outras infeções helmínticas, bem como o custo associado à sua aquisição.

O objetivo deste estudo foi a obtenção de um método serológico sensível, específico e de custo reduzido, facilmente aplicável em rotina. Considerando que, à semelhança do que acontece com outros parasitas, a componente lipídica presente no antígeno de larvas L2 de *T. canis* poderá estar na origem das reações cruzadas entre helmintas, procedeu-se à obtenção de antígeno deslipidizado (AgDs). Avaliou-se a sensibilidade e especificidade do AgDs produzido *in house* de larvas L2 de *T. canis* no imunodiagnóstico da LMV pelo método de micro-ELISA, através da deteção de anticorpos IgG e IgG₄, em comparação com o método de referência utilizado no laboratório de Helmintologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, o kit *Toxocara canis* IgG-ELISA, Bioactiva Diagnostica (kit ELISA-IgG®). Foram testados 142 soros de indivíduos com suspeita de LMV, 25 de indivíduos com outras helmintoses e 6 de indivíduos normais.

Os resultados demonstraram uma concordância significativa do AgDs com o kit ELISA-IgG®, apenas na deteção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. ($Kappa=0,168$; $p\text{-value}<0,05$). A sensibilidade do AgDs foi inferior à do kit ELISA-IgG®, sendo de 42,9% e de 22,6% na deteção de anticorpos IgG e IgG₄, respetivamente. A especificidade foi inferior à do kit ELISA-IgG® na deteção de anticorpos IgG (72% e 76%, respetivamente), no entanto foi superior na deteção de IgG₄ (80%) em relação ao kit. O menor número de resultados falsos positivos verificados com este isótipo, em comparação com a IgG, corrobora estudos publicados acerca do seu valor no imunodiagnóstico desta e de outras helmintoses. A infeção foi predominante no sexo masculino (60,7%), verificando-se diferenças estatisticamente significativas apenas com o kit ELISA-IgG® (χ^2 , $p\approx 0,008$ $<0,05$) em relação ao género. Quanto ao grupo etário, a distribuição da infeção foi predominante nos indivíduos com idade inferior a 10 anos (em todos os testes de micro-ELISA), mas as diferenças não apresentaram significado estatístico relativamente aos grupos de idade superior.

Neste estudo, a especificidade do kit ELISA-IgG® foi inferior à descrita pelo fabricante, registando reações cruzadas com soros de indivíduos com filariose, schistosomose e fasciolose, realçando a fragilidade dos métodos aplicados em rotina bem como a necessidade de investigação, sobretudo com vista à obtenção de preparações antigénicas de maior especificidade.

PALAVRAS-CHAVE: Toxocarose humana; larva migrante visceral; imunodiagnóstico; antígeno deslipidizado; micro-ELISA; Portugal.

Abstract

Human toxocarosis is a worldwide helminthic zoonosis caused by infection of *Toxocara* spp. second stage larvae (L2) and other nematodes of Ascaridida order. It may trigger, among several clinical syndromes, visceral toxocarosis or visceral larva *migrans* (VLM). As humans are paratenic hosts, the parasite is unable to achieve the adult stage, making diagnosis highly dependent of a combination of symptoms supported by positive serology and epidemiological history.

The reference method for toxocarosis immunodiagnosis is based on commercial micro-ELISA kit using *T. canis* L2 excretory/secretory antigens (E/S Ag) in the detection of IgG anti-*Toxocara* spp. antibodies in human serum. Despite its high sensitivity, the test presents some disadvantages, namely, the occurrence of cross-reactions with antibodies generated by other helminth infections, as well as the cost of the kits.

The aim of this study was to obtain a sensitive, specific and low cost serological method, easily applicable for routine VLM diagnosis. Considering that, similarly to other parasites, the lipid component of *T. canis* L2 larvae antigens may be responsible for cross-reactions with other helminths, we produced a delipidized antigen (AgDs) from *T. canis* L2 larvae.

The sensitivity and specificity of a micro-ELISA test using AgDs for IgG and IgG₄ anti-*Toxocara* antibody detection was evaluated in the immunodiagnosis of VLM, as compared with the reference commercial kit ELISA-IgG® (Bioactiva Diagnostica), used in the laboratory of Medical Helminthology of the Instituto de Higiene e Medicina Tropical. In total, 142 sera from suspected VLM individuals, 25 from individuals with other helminthiasis and 6 from non-infected controls were tested.

It was observed a significant level of agreement (Kappa=0,168; p-value<0,05). between AgDs and ELISA-IgG® kit, only for detection of anti-*Toxocara* spp. IgG antibodies.

The sensitivity of AgDs micro-ELISA was lower than the ELISA-IgG® Kit, 42.9% and 22.6% in the detection of IgG and IgG₄ antibodies, respectively. The specificity was lower than the ELISA-IgG® kit in the detection of IgG antibodies (72% and 76%, respectively), however it was higher for IgG₄ (80%). The lower number of false positive results with this isotype compared with IgG results corroborates previous studies about the usefulness of IgG₄ in the immunodiagnostic of this and other helminthiasis.

VLM infection was predominant in males (60.7%), but significant statistical differences between genders were only found with the ELISA-IgG® kit (χ^2 , $p \approx 0,008$ <0,05). Concerning age groups, infection was predominant in subjects younger than 10 years old (in all micro-ELISA tests), but the differences were not statistically significant comparing to the higher age groups.

In this study, the ELISA-IgG® kit specificity was lower than that described by the manufacturer, registering cross-reactions with sera from individuals with filariasis, schistosomiasis and fascioliasis, emphasizing some limitations of the methods applied in lab routine, as well as the need for further research, especially targeting antigenic preparations with greater specificity.

KEYWORDS: Human toxocarosis; visceral larva *migrans*; immunodiagnostic; delipidated antigen; micro-ELISA; Portugal.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE GERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE QUADROS	VIII
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. <i>Toxocara canis</i> - Biologia do parasita.....	5
2.1.1. Taxonomia e Morfologia	5
2.2. Ciclo de Vida e Transmissão.....	7
2.2.1. Hospedeiro Definitivo	7
2.2.2. Hospedeiro Paratênico.....	8
2.3. Toxocarose Humana	10
2.3.1. Relação parasita-hospedeiro	10
2.4. Síndromes Clínicas	10
2.4.1. Toxocarose Ocular (TO).....	11
2.4.2. Toxocarose Visceral (Larva migrante visceral).....	11
2.4.3. Neurotoxocarose (NT).....	12
2.4.4. Toxocarose Oculta e Toxocarose Comum.....	12
2.5. Diagnóstico Laboratorial	12
2.5.1. Análises laboratoriais	13
2.5.2. Exames complementares de diagnóstico	13
2.5.3. Métodos Serológicos.....	13
2.5.4. Diagnóstico Molecular	16

3.	OBJETIVOS.....	23
3.1.	Objetivo Geral.....	23
3.2.	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1.	Antígeno deslipidizado (AgDs) de larvas L2 de <i>T. canis</i>	25
4.1.1.	Obtenção de larvas L2 de <i>T. canis</i>	25
4.1.2.	Obtenção do antígeno deslipidizado (AgDs) de larvas L2 de <i>T. canis</i>	25
4.1.3.	Determinação da concentração de proteína da preparação antigénica.....	25
4.1.4.	Análise serológica.....	26
4.2.	Técnicas imunológicas utilizadas no diagnóstico de rotina de LMV	26
4.2.1.	Macro-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Macro-ELISA)	26
4.2.2.	Kit <i>Toxocara canis</i> IgG-ELISA Bioactiva Diagnostica (Kit ELISA-IgG®)	26
4.2.3.	Técnica de Imunodifusão (ID).....	27
4.2.4.	Técnica de Imunoeletrodifusão (IED)	27
4.3.	Micro-Enzyme Linked Immunosorbent Assays (Micro-ELISA).....	28
4.3.1.	Pesquisa de anticorpos IgG e IgG ₄ anti- <i>T. canis</i> no soro humano pelo método de Micro-ELISA.....	28
4.4.	Análise Estatística.....	30
5.	RESULTADOS	32
5.1.	Caracterização da amostra	32
5.2.	Resultado dos métodos utilizados no diagnóstico de rotina	33
5.2.1.	Comparação do resultado do Kit ELISA-IgG® com as provas precipitação	33
5.3.	Avaliação do antígeno deslipidizado de larvas L2 de <i>T. canis</i> (AgDs)	35
5.3.1.	Sensibilidade e especificidade do AgDs	35
5.3.4.	Comparação dos níveis séricos de anticorpos (Ac) anti- <i>Toxocara canis</i> em soros de indivíduos com suspeita de LMV	39
5.3.5.	Perfil dos indivíduos com serologia positiva para LMV nos testes de Micro-ELISA ..	42
6.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	45
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	ANEXO 1	60
	ANEXO 2	63

ANEXO 3	65
ANEXO 4	66

Índice de Figuras

Figura 1. As várias fases do ciclo de vida de <i>T. canis</i>	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. canis</i>	9
Figura 3. Amostras séricas enviadas para o LHM/IHMT.	32
Figura 4. Resultado dos diferentes métodos usados em rotina, Kit ELISA-IgG®, ID e IED.	34
Figura 5. Sensibilidade das provas de precipitação.	34
Figura 6. Sensibilidade e especificidade do AgDs de larvas L2 de <i>T. canis</i> pelo método de ELISA, na detecção de anticorpos IgG e IgG ₄	35
Figura 7. Reações cruzadas registadas nos três testes usados - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG ₄	36
Figura 8. Resultado do rastreio de LMV obtido pelo método de ELISA - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG ₄	37
Figura 9. Resultado do rastreio de LMV obtido pelo método de ELISA <i>in house</i> - ELISA-IgG e ELISA-IgG ₄ , e provas de precipitação – ID e IED.	38
Figura 10. Diagrama de extremos e quartis dos scores das densidades óticas do Ag E/S obtido pelo método Kit ELISA-IgG®, quando testado para o anticorpo IgG anti- <i>Toxocara</i> spp.	40
Figura 11. Diagrama de extremos e quartis dos scores das densidades óticas do AgDs obtido pelo método ELISA-IgG, quando testado para o anticorpo IgG anti- <i>Toxocara</i> spp.	41
Figura 12. Diagrama de extremos e quartis dos scores das densidades óticas do AgDs obtido pelo método ELISA-IgG ₄ , quando testado para o anticorpo IgG ₄ anti- <i>Toxocara</i> spp.	41
Figura 13. Distribuição do género dos indivíduos com serologia positiva para LMV, nos diferentes testes de micro-ELISA..	42
Figura 14. Distribuição dos grupos etários dos indivíduos com serologia positiva para LMV, nos diferentes testes de micro-ELISA.....	43

Índice de Quadros

Quadro 1: Perfil dos indivíduos avaliados.	32
Quadro 2. Níveis de concordância (Fator <i>Kappa</i>) obtido entre o Kit ELISA-IgG® e os testes ELISA-IgG, ELISA-IgG ₄ e provas de precipitação – ID e IED.....	38
Quadro 3. Níveis séricos de anticorpos anti- <i>Toxocara</i> spp. em indivíduos com serologia positiva na micro-ELISA - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG ₄	39
Quadro 4. Níveis séricos de anticorpos anti- <i>Toxocara</i> spp. em indivíduos com serologia inconclusiva na micro-ELISA - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG ₄	39

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
Ag E/S	Antígeno de excreção/secreção
AgDs	Antígeno deslipidizado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IED	Imunoelectrodifusão
ID	Imunodifusão
ITS-1	<i>Internal Transcribed Spacer1</i>
ITS-2	<i>Internal Transcribed Spacer 2</i>
L2	Larvas do segundo estágio
LCR	Líquido cefaloraquidiano
LHM/IHMT	Laboratório de Helmintologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical
LMV	Larva migrante visceral
NT	Neurotoxocarose
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	Rotações por minuto
TA	Temperatura ambiente
TBA-1	<i>Tubulin alpha chain 1</i>
Th1	<i>T Helper 1</i>
Th2	<i>T Helper 2</i>
TO	Toxocarose Ocular
SNC	Sistema nervoso central
WB	<i>Western Blot</i>

1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A toxocarose humana é uma zoonose helmíntica causada pela infecção larvar de *Toxocara* spp. e outros Ascaridida. Embora *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, parasitas intestinais de canídeos e felídeos respetivamente, sejam as espécies do género *Toxocara* mais associadas à infecção, o papel de *Toxocara malaysiensis* e *Toxocara vitulorum* como agentes zoonóticos continua por esclarecer [1, 2]. O Homem e muitos outros animais funcionam como hospedeiros paraténicos destas espécies, permitindo a sobrevivência dos parasitas em estado larvar por longo período de tempo e a possibilidade de alcançarem o estado adulto no hospedeiro definitivo [3, 4].

No humano, a infecção pode ocorrer quer pela ingestão accidental de ovos embrionados quer de larvas no segundo estágio, através do contato com fezes de gatos e cães jovens, de objetos contaminados, carne insuficientemente cozinhada de animais parasitados e pica [5, 6]. A migração larvar através do organismo humano e a capacidade de atingir vários tecidos e órgãos desencadeia a síndrome de larva migrante visceral (LMV), descrita por Beaver *et. al* em 1952 [5, 7].

A habilidade de bloquear a resposta imune do hospedeiro permite a sobrevivência do parasita nos tecidos e está associada à excreção/secreção de moléculas antigénicas somáticas [8].

Fatores como o padrão de migração e localização da larva de *Toxocara* spp., a carga parasitária e a resposta imune do hospedeiro, determinam as manifestações clínicas da doença. Esta pode apresentar-se como Toxocarose Ocular (TO), Neurotoxocarose (NT), Toxocarose Visceral e Toxocarose Comum ou Oculta, quando os sintomas da infecção se revelam inespecíficos ou ausentes, respetivamente [1, 6].

O tratamento de eleição baseia-se na administração de fármacos benzimidazólicos em combinação com corticoesteroides, variável de acordo com a sintomatologia e localização larvar [9].

A zoonose é de distribuição mundial e tem revelado uma seroprevalência particularmente elevada em crianças socioeconomicamente desfavorecidas, tanto em regiões tropicais, subtropicais como em países industrializados. Adicionalmente, a alta prevalência do parasita em cães e gatos favorece a contaminação ambiental que, associada a comportamentos como pica, geofagia e contato próximo com estes animais, potencia o

risco de infecção [5, 10]. Contudo, outro nemátode tem vindo a ser considerado agente de LMV. Trata-se de *Ascaris suum*, um parasita intestinal de suínos domésticos com elevada prevalência nos países industrializados, que à semelhança do género *Toxocara*, é transmitido aos humanos pela ingestão accidental de ovos embrionados [11].

A variedade de espécies passíveis de causar LMV em humanos bem como a multiplicidade das vias de transmissão e hospedeiros, tanto definitivos como paraténicos, dificultam o controlo, prevenção e erradicação da doença, cujo diagnóstico se baseia nas manifestações clínicas e é suportado por análises laboratoriais, nomeadamente a contagem de eosinófilos no sangue periférico e a concentração de anticorpos IgE total no soro, técnicas de imagiologia e de serologia [1, 4]. Contudo, é dificultado por fatores como a variabilidade e inespecificidade tanto dos sintomas de infecção como dos resultados das análises laboratoriais, focando-se no diagnóstico imunológico [1, 7]. A técnica de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) baseada em antígenos de excreção/secreção de larvas L2 tem sido o método de eleição na deteção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. no soro humano, que embora de elevada sensibilidade tem revelado não só reações cruzadas com antígenos de outros nemátodes como falta de padronização de critérios [2, 12]. Adicionalmente, a ausência de programas de controlo e de uma vacina contra esta zoonose realça a importância do papel do diagnóstico da infecção humana, levando à procura de métodos mais fiáveis [12]. Nesse sentido, várias alternativas têm sido estudadas, nomeadamente a deteção concomitante de anticorpos específicos IgG e IgG₄ anti-*T. canis* através de ELISA baseada em antígenos de excreção/secreção (Ag E/S), demonstrando potencial para otimizar a especificidade do método de ELISA no diagnóstico desta doença negligenciada [13, 14].

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de Literatura

2.1. *Toxocara canis* - Biologia do parasita

Uma vez que a maioria dos estudos epidemiológicos tem atribuído os casos de toxocarose humana a *Toxocara canis*, será esta a espécie descrita.

2.1.1. Taxonomia e Morfologia

A espécie *Toxocara canis* (Werner, 1782), parasita intestinal de canídeos domésticos e selvagens com distribuição mundial, pertence ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaridoidea, Família Toxocaridae [14, 15].

Os vermes de *T. canis* são dióicos e apresentam dimorfismo sexual. Ambos os sexos possuem uma morfologia cilíndrica de simetria radial, característica dos nemátodes, que é mantida ao longo dos estádios de desenvolvimento através de uma cutícula externa acelular. O corpo do parasita é alongado, não segmentado, apresentando na extremidade anterior três lábios e duas asas cervicais [16].

O comprimento dos machos pode variar entre 4 e 6 cm, apresentando a extremidade posterior enrolada no sentido dorsoventral e espículas projetadas para fora da cloaca. As fêmeas são mais longas que os machos (Figura 1 A), com 6,5 a 15 cm de comprimento, possuem a extremidade posterior retilínea e uma postura média diária de 200.000 ovos [16].

Os ovos de *T. canis* (Figura 1 B-G), possuem forma esférica a ovoide, com cerca de 85 µm de largura e 75 µm de comprimento, e uma casca espessa castanha e de aspeto ondulado que lhes confere resistência [17, 18].

O embrionamento ocorre no ambiente e o período de desenvolvimento até ao estágio infetante (L2) é dependente das condições de temperatura e humidade, sendo cerca de duas semanas para temperaturas entre os 25 e 30°C e superior a cinco semanas para temperaturas entre os 12 e 18°C [2, 19].

A seca e temperaturas extremas podem comprometer a maturação e viabilidade dos ovos de *T. canis* [2].

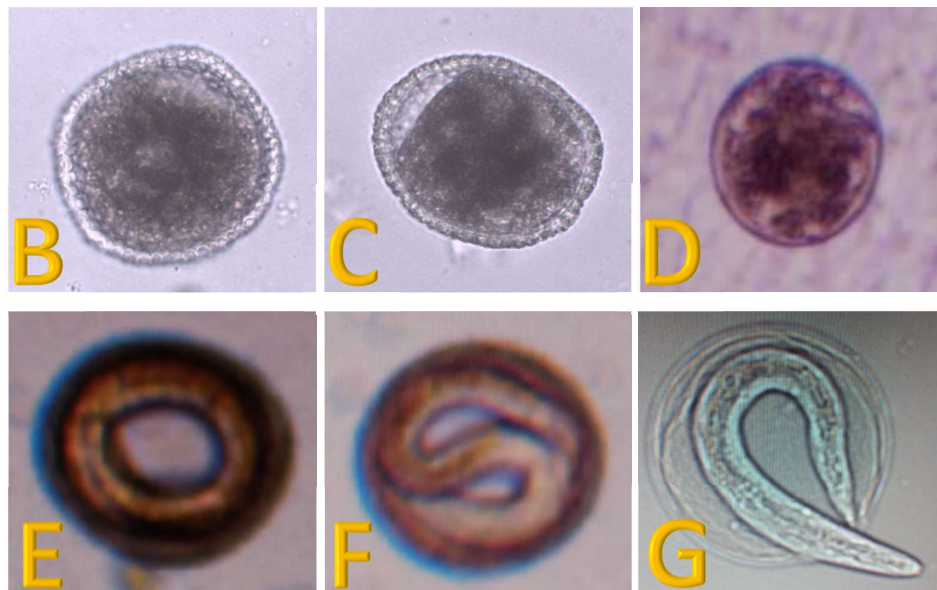
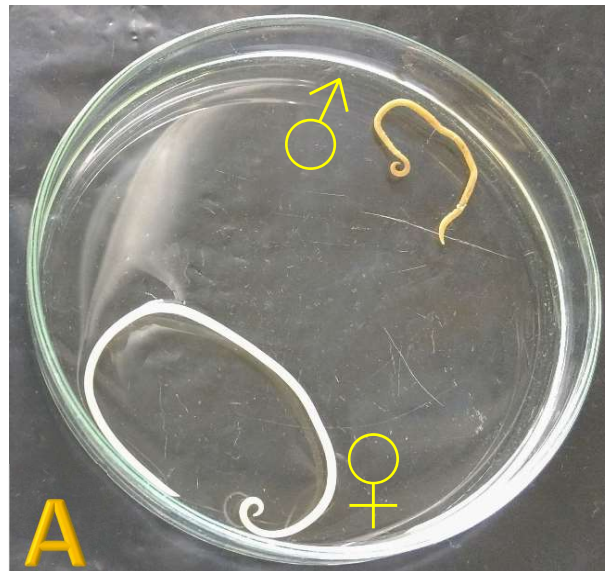


Figura 1. As várias fases do ciclo de vida de *T. canis*. (A) Vermes adultos. (B) Ovo não fecundado. (C) Ovo não embrionado. (D) Ovo com embrião. (E-F) Ovo embrionado com larva L2. (G) Eclosão artificial da larva L2. (Originais de C. Peixoto)

2.2. Ciclo de Vida e Transmissão

2.2.1. Hospedeiro Definitivo

A infecção do hospedeiro definitivo pode ocorrer tanto pela ingestão de ovos embrionados presentes no solo, como de larvas em tecidos de hospedeiros paratênicos ou libertadas nas fezes de cachorros em período de amamentação [2, 5, 18].

Adicionalmente, as vias transplacentária e transmamária parecem explicar a elevada incidência de infecção por *T. canis* em canídeos recém-nascidos [17].

O trajeto do parasita parece ser influenciado tanto pela via de infecção como pela idade e imunidade do hospedeiro [2]. Em cachorros com menos de cinco semanas, a ingestão de ovos embrionados parece desencadear uma migração larvar orgânica através do fígado e pulmões. Esta migração inicia-se após a eclosão das larvas no intestino delgado e posterior evasão da mucosa, permitindo a passagem por diferentes estádios de desenvolvimento. Quando alcançam a traqueia, estágio L3, são deglutidas e reiniciam a migração ao longo do tubo digestivo. No intestino delgado, atingem a maturação sexual e, após a fecundação, a fêmea inicia a oviposição. Cerca de cinco semanas pós-infecção, os ovos não embrionados são eliminados nas fezes do hospedeiro [17, 18].

Em cães jovens e adultos, tanto as larvas L2 eclodidas no intestino como as ingeridas em tecidos de hospedeiros paratênicos parecem ter dificuldade não só em penetrar a mucosa como em completar a migração, podendo desencadear infecções latentes.

O número de larvas ingeridas e a resposta imunitária desencadeada no hospedeiro parecem estar na origem de uma migração larvar tecidular e posterior enquistamento, mantendo-se viáveis por longos períodos de tempo [2, 17].

O desenquistamento das larvas L2 parece ocorrer em cadelas gestantes, ao longo do terceiro trimestre, possivelmente devido às alterações hormonais. Esta reativação pode desencadear uma migração transplacentária com infecção intra-uterina subsequente, ou a invasão das glândulas mamárias [1, 2, 17].

Assim, os cachorros com infecção pré-natal começam a eliminar ovos de *T. canis* cerca de 16 dias após o nascimento, enquanto aqueles que adquirem o parasita através do leite materno começam a eliminar a larva L3 num período de aproximadamente 38 dias [1].

2.2.2. Hospedeiro Paraténico

O Homem e muitos outros animais funcionam como hospedeiros paraténicos de *Toxocara* spp., permitindo a sobrevivência do parasita em estado larvar por um longo período e, no caso dos reservatórios animais, a possibilidade de, através da predação, completar o ciclo de vida no hospedeiro definitivo [2, 4].

Embora tenha sido relatado em 2006 um caso aparente de transmissão congénita de toxoplasmose ocular num recém-nascido prematuro [2, 20], as fontes mais comuns de infecção humana tratam-se da ingestão accidental de ovos embrionados e de larvas no segundo estágio (L2) [1]. A ingestão dos ovos pode ocorrer tanto pelo contato com fezes de animais parasitados e objetos contaminados, como através do consumo de água, vegetais mal lavados e geofagia, e das larvas L2 pelo consumo de carne e vísceras insuficientemente cozidas de outros hospedeiros paraténicos infetados, como aves, ruminantes e suínos (Figura 2) [5, 6].

No hospedeiro paraténico o ciclo de vida de *Toxocara* spp. não se completa. Após a ingestão dos ovos embrionados, as larvas L2 eclodem, penetram no intestino delgado e entram na circulação sanguínea. Iniciam uma migração orgânica, através do fígado e pulmões, podendo estender-se aos rins, coração, cérebro, olhos e músculos, mantendo-se viáveis por um longo período [7, 17, 18].

A sintomatologia associada à infecção por *Toxocara* spp. está dependente da idade e intensidade da resposta imunitária do hospedeiro, embora em grande parte dos casos seja assintomática [19, 21]. Adicionalmente, a intensidade (carga parasitária) e duração da infecção, tal como os órgãos envolvidos na migração larvar, podem originar várias síndromes clínicas [19].

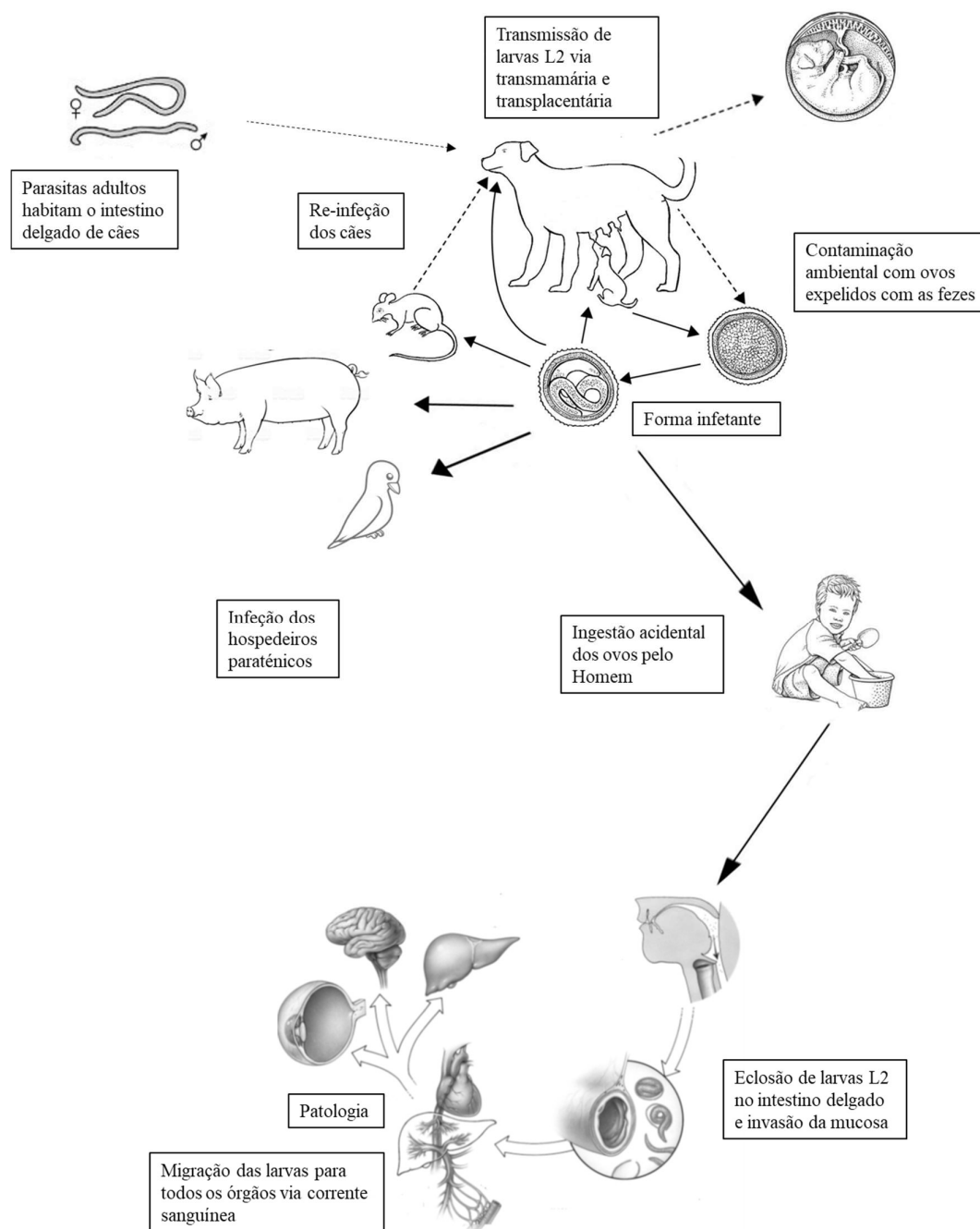


Figura 2. Ciclo de vida de *T. canis*. Adaptado de Veterian Key (<https://veteriankey.com>) e Despomier (2003) [18].

2.3. Toxocarose Humana

2.3.1. Relação parasita-hospedeiro

A presença de larvas L2 no interior de órgãos e tecidos do hospedeiro é seguida da libertação de antígenos solúveis, denominados de excreção/secreção (Ag E/S), produzidos pela glândula esofágica e camada cuticular externa do parasita [4, 21]. Estes antígenos, constituídos por glicoproteínas como mucinas e lectinas, e uma fração alergénica também identificada nos vermes adultos, a tubulina de cadeia alfa (TBA-1, Tubulin alpha chain), parecem ativar e modular a resposta imune do hospedeiro [4, 14, 22].

Para além da resposta do tipo Th₂, característica de infeções helmínticas, na qual ocorre a produção das interleucinas (IL) 4, 5 e 13 que induzem a ativação de eosinófilos e produção de imunoglobulina E (IgE) no local de infeção, as larvas de *Toxocara* spp. parecem desencadear simultaneamente no hospedeiro humano uma resposta Th1 [19, 21, 23]. De acordo com Maizels (2013), as glicoproteínas dos antígenos de excreção/secreção de *Toxocara* spp. (Ag E/S) são similares às envolvidas na inflamação tecidual dos mamíferos, indicando que o parasita induz a migração de células polimorfonucleares [4, 19]. Assim, o recrutamento de anticorpos e células do hospedeiro ao local de infeção e posterior ligação às proteínas da membrana superficial do parasita parece desencadear a formação de granulomas [4, 21]. No entanto, a libertação e renovação contínua deste revestimento lábil permite não só a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro que é direcionado ao antígeno solúvel e não ao somático, como a sobrevivência da larva por um longo período [14].

2.4. Síndromes Clínicas

Embora grande parte das infeções por *Toxocara* spp. possam ser assintomáticas, a migração larvar através de órgãos e tecidos pode levar a uma variedade de síndromes clínicas [19].

2.4.1. Toxocarose Ocular (TO)

A doença ocular resulta da migração larvar de *Toxocara* spp. através dos vasos sanguíneos e invasão da parte posterior do olho ou nervo óptico [2, 6, 18].

As reações granulomatosas induzidas pelas larvas L2 parecem danificar a retina e diminuir a acuidade visual [2]. Em casos mais graves pode verificar-se descolamento da retina e até mesmo perda de visão permanente [18].

Embora haja relatos de envolvimento bilateral, geralmente a infecção é unilateral e é causada por uma única larva, não havendo eosinofilia associada [2]. No entanto, de acordo com Magnaval *et al.* (2002), se a infecção ocular resultar de um envolvimento sistêmico, o número de eosinófilos poderá estar aumentado [14].

Os sintomas podem variar desde rubor, dor ocular, visão diminuída ou fotofobia, mas também podem estar ausentes, existindo relatos de infecções subclínicas detetadas em exames oftalmológicos de rotina [2, 6].

O grupo etário mais afetado com TO, segundo Fan *et al.* (2013), são crianças entre os 5 e 10 anos, apresentando comprometimento unilateral da visão acompanhado de estrabismo ocasional [19].

2.4.2. Toxocarose Visceral (Larva migrante visceral)

De acordo com Magnaval *et al.* (2001), a toxocarose visceral ou larva migrante visceral (LMV) afeta principalmente crianças entre os 2 e 7 anos de idade, com história de geofagia e exposição a cachorros [24]. Assim, a presença de um elevado número de parasitas e/ou infecções repetidas parecem estar na origem da eosinofilia persistente, leucocitose e hipergamaglobulinémia, típicos da doença. As manifestações clínicas estão relacionadas com a migração larvar de *Toxocara* spp. no fígado e pulmões e incluem febre, hepatoesplenomegalia, desconforto abdominal, perda de apetite, bem como sibilos, tosse e asma [18, 19]. Adicionalmente, embora raros, já foram relatados casos de envolvimento cardíaco e renal [2, 18].

2.4.3. Neurotoxocarose (NT)

A invasão do sistema nervoso central (SNC) por larvas de *Toxocara* spp. desencadeia a neurotoxocarose (NT) [19].

De acordo com Fan *et al.* (2013), a manifestação da infecção é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, pela exposição prévia ao parasita e quantidade de larvas ou ovos ingeridos [21]. Além disso, o número de larvas presentes no cérebro e espinhal medula, bem como a inflamação e danos subsequentes podem estar na origem de casos de meningoencefalite, mielite, vasculite cerebral, epilepsia, deficiência visual e hipersensibilidade à luz [19].

Contudo, a ausência de sinais neurológicos reconhecíveis pode estar associada a infecções repetidas de baixa carga parasitária [21].

2.4.4. Toxocarose Oculta e Toxocarose Comum

Os níveis elevados de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. detetados em indivíduos assintomáticos ou com sintomas inespecíficos levaram ao reconhecimento de mais duas síndromes – a toxocarose oculta e toxocarose comum [19].

A forma oculta da doença, descrita em crianças, foi caracterizada clinicamente por febre, anorexia, cefaleias, dor abdominal, náuseas, vômitos, letargia, distúrbios do sono e comportamentais. Casos de faringite, pneumonia, tosse, sibilância, dores nos membros, linfadenite cervical e hepatomegalia também têm sido reportados. A toxocarose comum, descrita em adultos, refere dor abdominal, fraqueza, prurido, erupção cutânea e dificuldade respiratória como sintomas mais comuns [2, 24].

2.5. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da toxocarose humana baseia-se na associação de sinais clínicos com resultados laboratoriais, imagiologia e serologia [24].

2.5.1. Análises laboratoriais

Como já foi referido, as manifestações clínicas da doença carecem de especificidade e são determinadas por fatores como a localização da infeção, carga parasitária e resposta imunitária do hospedeiro aos antígenos larvares [7, 19]. O mesmo parece verificar-se na contagem de eosinófilos no sangue periférico e concentração de anticorpos IgE total no soro. Enquanto a toxocarose visceral tem sido associada a eosinofilia e níveis de IgE total elevados, nas formas comum ou oculta da doença este aumento acentuado não se verifica, e na ocular ambos os parâmetros parecem não sofrer alteração [5, 21, 22]. No entanto, a presença concomitante de alergias cutâneas crónicas dificulta esta associação [10, 14]. A presença de eosinófilos no líquido cefalorraquidiano (LCR) e humor vítreo e aquoso é também sugestivo da presença de *Toxocara* spp. no SNC e olho, respetivamente [14].

2.5.2. Exames complementares de diagnóstico

Os exames ecográficos, de ressonância magnética e tomografia axial computadorizada (TAC) têm revelado utilidade na deteção e localização de lesões e granulomas causados por *Toxocara* spp. [22]. Contudo, a imagiologia não diferencia as alterações detetadas de lesões de origem inflamatória nem de granulomas de outras etiologias [25, 26, 27]. Adicionalmente, requer biópsia dos órgãos e tecidos lesados para identificação microscópica do parasita, o que não é aplicável em rotina [2, 18, 19].

2.5.3. Métodos Serológicos

A serologia tem assumido o papel central no diagnóstico diferencial desta zoonose, sendo o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) o método *gold standard* [22, 24, 25].

2.5.3.1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Disponível em kits comerciais ou produzidos *in house*, a ELISA permite a deteção de anticorpos IgG no soro humano através do uso de antígenos de excreção/secreção de larvas L2 de *T. canis* (Ag E/S), numa adaptação do método de De Savigny (1975) [14, 28].

As larvas L2 são obtidas a partir de ovos extraídos do útero de fêmeas de *T. canis*, mantidos numa cultura de formalina a 1%, durante 40 dias a 27°C até embrionamento [14, 29]. As larvas eclodidas e recuperadas através de uma adaptação do método de Baermann são mantidas em meio de RPMI, a 37°C numa atmosfera suplementada com 5% de CO₂ e o Ag E/S é obtido a partir do sobrenadante [14, 29].

Segundo Fan *et al.* (2013), os testes de diagnóstico imunológico que utilizem antígenos de excreção/secreção produzidos a partir de larvas L2 de *T. canis* para detecção de anticorpos específicos anti-*Toxocara* spp. possuem sensibilidade e especificidade para diagnosticar a toxocarose humana [19]. Contudo, o teste de ELISA apresenta um valor elevado de reações cruzadas com outros geohelmintas e outros parasitas, nomeadamente em regiões com poliparasitismo [19, 24]. De acordo com Noordin *et al.* (2005), soros de doentes co-infetados com *Ascaris* spp., *Strongyloides* spp., Filárias e *Schistosoma* spp. apresentam reações positivas com Ag E/S [13].

Esta limitação tem sido associada à qualidade do Ag E/S que pode ser comprometida pela contaminação do meio de cultura com antígenos somáticos de larvas inviáveis, e à já conhecida homologia antigénica entre nemátodes [30].

2.5.3.2. Imunoblotting (*Western Blot*, WB)

A confirmação das serologias positivas no teste de ELISA por imunoblotting, de acordo com Schneider *et al.* (2015), eleva a sensibilidade e especificidade do diagnóstico de LMV [2, 11].

A técnica de WB é usada na detecção e localização de proteínas, bem como na ligação destas a anticorpos específicos. Baseia-se na reação de frações proteicas de baixo peso molecular (24-32 kDa) de antígenos de excreção/secreção de larvas de *T. canis* com anticorpos IgG humanos, mas por se tratar de uma técnica morosa e dispendiosa não tem sido aplicada em rotina [7, 19]. Nguyen *et al.* (2017) demonstraram que a proteína 33.1 kDa de Ag E/S larvares era a fração mais reativa com anticorpos específicos IgG em humanos e de animais infetados com *T. canis* e *T. cati*, realçando a alta especificidade das frações proteicas de baixo peso molecular em contraste com a elevada reatividade sérica de anticorpos IgG de humanos poliparasitados com frações de peso molecular mais elevado [7].

2.5.3.3. Antígenos circulantes

Dado que a larva de *T. canis* presente no organismo humano mantém um metabolismo ativo e subsequente produção antigénica, foi proposta a deteção e quantificação de Ag E/S circulantes através de ELISA com anticorpos monoclonais [12, 31].

Rodríguez-Caballero *et al.* (2015) sugeriram a presença de Ag E/S no soro humano como indicador de infeção patente, uma vez que a deteção de anticorpos específicos IgG anti-*Toxocara* spp. não permite determinar o *status* (estado) da infeção, de forma a estabelecer o *timing* e tratamento adequado [7, 31].

No entanto, para além da baixa reatividade obtida no ensaio ser sugestiva de uma rápida neutralização destes antígenos por anticorpos séricos do hospedeiro imediatamente após a infeção, parte dos resultados positivos revelaram infeções com outros helmintas indicando ausência de especificidade dos anticorpos monoclonais [7, 12, 31].

2.5.3.4. Deteção de classes de imunoglobulina e isótipos de IgG

Com o intuito de otimizar a especificidade do teste de ELISA, foi sugerida a deteção de outras classes de imunoglobulinas para além da IgG no soro humano, uma vez que a produção de anticorpos específicos IgG e IgE anti-*Toxocara* spp. persiste ao longo da infeção [12]. Somente a deteção de IgE contra Ag E/S revelou ser aplicável em rotina, em paralelo com a deteção de IgG. Quando em simultâneo, permitem não só diagnosticar a toxocarose como monitorizar o tratamento anti-helmítico em soros de doentes com sintomatologia atópica. A expressão isolada da IgE não diferencia uma toxocarose ativa, relacionada com a invasão larvar dos tecidos do hospedeiro, de reações alérgicas relacionadas com a infeção [4]. No entanto, se detetada no humor aquoso poderá avaliar o envolvimento ocular na infeção [14].

Em relação aos isótipos de IgG (IgG₁₋₄), embora todos sejam produzidos contra Ag E/S, de acordo com Noordin *et al.* (2005), apenas a IgG₄ regista um menor número de resultados falsos positivos no diagnóstico da toxocarose, em comparação com a IgG, quando testada em amostras com outras infeções [19, 31]. Adicionalmente, estudos com outras helmintoses, nomeadamente filariose linfática, revelaram que níveis elevados de anticorpos específicos IgG₄ no soro humano representavam uma infeção ativa e que o declínio acentuado desta subclasse era verificado após tratamento quimioterápico [13, 14]. Desta forma, Noordin *et al.* (2005) constataram que a deteção concomitante de

anticorpos específicos IgG e IgG₄ anti-*T. canis*, através de ELISA baseada em Ag E/S, poderia otimizar o diagnóstico da toxocarose [13]. Para além de a elevação de ambos os parâmetros refletirem uma infeção em curso, a avaliação longitudinal destes anticorpos específicos anti-*Toxocara* spp. poderá revelar-se útil na monitorização da eficácia do tratamento [12, 13, 14].

2.5.3.5. Avidéz de anticorpos IgG

A determinação da avidéz de anticorpos IgG consiste na avaliação da ligação destes anticorpos a antígenos específicos, e tem sido usada no diagnóstico de doenças infecciosas permitindo a distinção entre infeção recente e antiga [30].

Uma infeção recente é caracterizada por uma avidéz baixa enquanto as infeções crónicas revelam uma ligação de anticorpos IgG a antígenos específicos mais forte, ou seja, uma avidéz elevada. O teste desenvolvido por Hubner *et al.* (2001) permite a deteção de anticorpos IgG específicos anti-*Toxocara* spp. no soro humano através de ELISA e a determinação do estado da infeção através da dissociação do complexo antígeno-anticorpo pela ação da ureia, um desnaturante das pontes de hidrogénio [32]. Consiste no cálculo do índice de avidéz, através do rácio entre níveis de IgG sérico tratado com ureia e sem tratamento, multiplicado por cem. De acordo com este método, um índice inferior a 40 revela uma avidéz baixa, sendo indicativo de uma infeção recente, enquanto valores superiores a 40 são considerados de avidéz elevada e, portanto, uma infeção antiga [33].

2.5.4. Diagnóstico Molecular

A aplicação de métodos moleculares, nomeadamente *Polymerase Chain Reaction* (PCR), para deteção de ADN de *Toxocara* spp. em amostras biológicas humanas tem sido proposta [12]. Baseia-se na amplificação de regiões conservadas do ADN ribossomal, ITS-1 e ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer*) para diferenciação entre espécies. Em animais, este método tem sido aplicado na identificação dos ovos encontrados nas fezes de hospedeiros definitivos, dada a dificuldade na distinção microscópica entre *T. canis* e *T. cati*, e também de larvas em tecidos e outros fluidos orgânicos de modelos animais [1, 12].

Em humanos, de acordo com Fillaux & Magnaval (2013), este método não é aplicável em rotina. Para além da baixa probabilidade de obter um resultado positivo dada a maioria dos casos de doença ser causada por um número reduzido de larvas, a natureza invasiva do método de colheita de tecidos só se revela ética em biópsias cirúrgicas ou necrópsias [14]. No entanto, de acordo com alguns estudos, a PCR tem revelado potencial de ser aplicada no diagnóstico de toxocarose ocular e cerebral [12, 14].

2.6. Epidemiologia

A maioria dos casos de toxocarose humana relatados em estudos epidemiológicos, têm sido associados a *T. canis* [1]. No entanto, há evidências de que outras espécies podem desencadear a síndrome de LMV em humanos, nomeadamente *T. cati* e *Ascaris suum*, parasitas intestinais de felídeos e suínos respetivamente [1, 11, 19].

Para além da percentagem elevada de gatos errantes e selvagens infetados com *T. cati* registada na Dinamarca e Reino Unido, 79% e 91% respetivamente, a prevalência elevada de anticorpos humanos anti-*Toxocara* spp. em países islâmicos, onde os cães são evitados por motivos religiosos e os gatos são favorecidos como animais de estimação, evidenciou a importância desta espécie [19]. A distinção entre *T. canis* e *T. cati* é dificultada tanto pela semelhança morfológica dos ovos e antigénica entre as duas espécies, bem como no modo de infeção humana, apenas sendo viável mediante aplicação de métodos moleculares [1, 12].

Recentemente, outra espécie parece estar na origem tanto da infeção em felídeos como em humanos. Trata-se de *Toxocara malaysiensis*, identificada na China, Malásia e Vietnam como ascarídeo intestinal comum de gatos domésticos [2, 3]. Um estudo realizado no Vietnam não só confirmou a semelhança genética entre *T. malaysiensis* e *T. cati* como revelou as características microscópicas do verme adulto que permitem distingui-lo das outras espécies do género *Toxocara* [3].

Quanto a *A. suum*, um estudo realizado entre 2012 e 2014 na Áustria, um dos maiores produtores de suínos da Europa, analisou 417 amostras de pacientes com suspeita de LMV e revelou incidências de anticorpos IgG anti-*A. suum* de 13,2% contra 12,9% de anticorpos anti-*Toxocara* spp. [11]. Anteriormente já haviam sido reportados casos de

sintomatologia hepática, pulmonar e cerebral associada à migração larvar deste parasita, bem como uma elevada seroprevalência de anticorpos anti-*A. suum* na população de países produtores de suínos e onde as fezes destes animais são utilizadas como fertilizante [1, 11].

Para além da similaridade no ciclo de vida, fonte de infecção humana e sintomatologia associada, a semelhança genética entre *A. suum* e *Toxocara canis* poderá ter originado no passado reações cruzadas no diagnóstico serológico [1, 8, 14]

Outra espécie com potencial zoonótico, *Toxocara vitulorum*, tem vindo a ser reconhecida como agente de toxocarose nas regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente crianças [2]. O ciclo de vida deste parasita intestinal de bovinos e búfalos é similar ao das outras espécies do género *Toxocara*, verificando-se *in vitro* que os ovos demoram entre 7 a 12 dias a alcançar o estágio infetante, a temperaturas entre os 28 e 30 °C, sendo igualmente bastante resistentes [2].

De acordo com o *Center for Food Security and Public Health* (2016), até à data não se conhecem outras espécies pertencentes ao género *Toxocara* capazes de infetar humanos [2].

2.7. Seroprevalência

A toxocarose humana ou LMV, de acordo com Fillaux & Magnaval (2013), é uma das helmintoses mais comuns no mundo dada a proximidade do Homem com animais domésticos e peri-domésticos [14]. A prevalência de anticorpos anti-*Toxocara* spp. é variável entre países, registando taxas mais elevadas nas regiões menos desenvolvidas [14, 19]. De acordo com Fan *et al.* (2013), a contaminação do solo de parques urbanos com ovos de *Toxocara* spp. é comum na maioria dos países, independentemente do nível de desenvolvimento. No entanto, o grau da contaminação ambiental parece influenciar o risco de infecção, que por sua vez é potenciado pelas condições socioeconómicas, educacionais e sanitárias desfavorecidas [19]. Adicionalmente, o clima quente e húmido, encontrado principalmente nos trópicos, também poderá contribuir para o desenvolvimento e viabilidade do estado infetante do parasita [6, 14]. Estudos epidemiológicos registam seroprevalências de 93% na Ilha da Reunião, 81% no Nepal, 63,2% na Indonésia, 58% na Malásia e 36% no Brasil [19]. Na Suazilândia e São Tomé

e Príncipe, as crianças em idade escolar revelaram taxas de 86,4% (n = 360) e 98,8% (n = 255), respectivamente [19]. A seroprevalência particularmente elevada em crianças tem sido associada não só à imaturidade imunitária como a comportamentos de pica e geofagia, à posse anterior de cães e gatos, bem como o contato próximo com estes animais [1, 5, 19].

Em adultos, a reinfeção contínua é apontada como causa provável das taxas altas de anticorpos anti-*Toxocara* spp. encontradas [1]. No Japão e outros países asiáticos, a maioria dos casos de toxocarose foi associada ao consumo de vísceras e tecidos crus ou insuficientemente cozidos de hospedeiros paratênicos [2].

No entanto, o impacto da toxocarose na saúde pública poderá estar subestimado [7]. Para além da dificuldade no reconhecimento da doença, relacionada com a ausência de sintomas e acesso limitado a meios de diagnóstico de custo elevado, os métodos serológicos aplicados e respetivos *cut-off* são variáveis entre países [19, 34].

2.8. Tratamento

De acordo com Magnaval *et al.* (2001), a decisão de tratar um doente com toxocarose é dependente do tipo e gravidade dos sinais clínicos [22]. Dos fármacos anti-helmínticos mais usados, os benzimidazóis (albendazol, mebendazol, tiabendazol e fenbendazol) têm revelado ser preferenciais no tratamento desta zoonose, em comparação com a dietilcarbamazina, praziquantel e ivermectina [35]. No entanto, a escolha do fármaco a administrar nas diferentes síndromes parece diferir entre estudos, assim como a posologia e duração da terapêutica [2, 9]. A destruição e morte larvar provocada pela ação dos anti-helmínticos poderá desencadear reações de hipersensibilidade, razão pela qual há a indicação de administração concomitante de corticosteroides [6, 18, 21].

Segundo Fan *et. al* (2015), o albendazol e mebendazol estão entre as opções de tratamento da TO, cuja duração é de cinco dias [21].

Nos casos de NT, o albendazol tem sido o fármaco de eleição, tanto pela toxicidade reduzida comparativamente aos outros benzimidazóis, como pela boa penetração nos tecidos nervosos [21]. A duração recomendada do tratamento é de 3 semanas, com possível necessidade de repetição [9].

Hombu *et al.* (2017), demonstraram que a taxa de cura de doentes tratados com albendazol durante um logo período, quatro a oito semanas, foi superior ao regime de cinco dias, em todas as síndromes causadas pela larva migrante [9].

O albendazol é um fármaco de largo espectro de atividade contra helmintas, protozoários intestinais e filárias, amplamente utilizado em medicina humana e veterinária não só pela elevada tolerância e efeitos adversos reduzidos no organismo, mas também pela evidência experimental de ação ovicida, larvicida e vermícida [35, 36].

Contudo, vários estudos *in vivo* têm demonstrado uma absorção fraca e variável ao nível do trato gastrointestinal tanto do albendazol como do mebendazol, possivelmente relacionada com a baixa solubilidade aquosa, melhorando quando administrados com uma refeição lipídica [22, 35].

De acordo com Prichard (2007), o uso extensivo e à escala global de benzimidazóis em programas de controlo e eliminação de helmintoses e outras parasitoses humanas poderá levar ao desenvolvimento de resistências [37, 38]. A escassez de anti-helmínticos alternativos torna imperativa a aplicação de programas de monitorização e avaliação da eficácia terapêutica, de forma a tornar possível a identificação dos genes responsáveis pela resistência parasitária aos fármacos [38].

Neste sentido, Zhu *et al.* (2015), sequenciaram o genoma de *T. canis* de forma a identificar e localizar genes cuja inativação possa eliminar seletivamente o parasita, sem danos para o hospedeiro mamífero [8]. De acordo com o estudo, esta abordagem poderá proporcionar o desenvolvimento não só de novos fármacos e testes de diagnóstico, como de vacinas para combater a toxocarose e outras zoonoses [8].

A descoberta de novos compostos bioactivos com base na avaliação biológica da eficácia de plantas usadas em medicina tradicional em várias regiões do mundo tem centrado o interesse da comunidade científica [39]. Vários estudos *in vitro* têm registado ação antiparasitária de extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas em comparação com os benzimidazóis mais usados, revelando potencial para o desenvolvimento de fitofármacos antiparasitários [40].

2.9. Controlo e Prevenção

A diversidade de hospedeiros definitivos e paraténicos das espécies do género *Toxocara* bem como as alterações climáticas parecem dificultar o controlo, prevenção e erradicação desta zoonose [41]. No entanto, há a necessidade de implementação de medidas que visem a prevenção da infeção e reinfeção humana. Algumas das já instituídas incluem o controlo reprodutivo de cães e gatos tanto de estimação como vadios, bem como a restrição do acesso destes animais a locais públicos, especialmente parques infantis, de forma a reduzir não só o número de animais jovens na população, como evitar a contaminação ambiental com as suas fezes [34, 42]. Para tal é necessária a sensibilização da população para a adoção de boas práticas de higiene, não só na remoção dos dejetos dos respetivos animais de estimação do solo doméstico e público, como do foro pessoal [43]. A lavagem das mãos e o consumo de alimentos bem cozinhados poderá evitar a ingestão acidental de ovos infetantes [41]. Outras medidas de controlo desta zoonose incluem o tratamento anti-helmíntico regular de cães e gatos com início em idade precoce, bem como a substituição das caixas de areia de parques infantis e de lazer por outro tipo de pavimento [18, 34, 42].

3

OBJETIVOS

3. Objetivos

A variedade de espécies passíveis de causar LMV em humanos bem como a multiplicidade das vias de transmissão e hospedeiros, tanto definitivos como paraténicos, dificultam o controlo, prevenção e erradicação da doença.

Uma vez que na toxocarose não há eliminação por parte do Homem de qualquer forma parasitária, o diagnóstico depende maioritariamente de uma combinação da presença de sintomas e sinais e clínicos suportados por uma serologia positiva e história epidemiológica.

Atualmente, o método de referência no diagnóstico desta zoonose baseia-se no uso de kits comerciais de micro-ELISA que utilizam o antígeno de excreção/secreção de *Toxocara canis* para a deteção de anticorpos IgG contra o parasita no soro ou plasma humano. No entanto, em países onde os geohelmintas são endémicos e o poliparasitismo é comum, o serodiagnóstico de LMV pode ser dificultado. Além disso, o custo destes testes pode representar um entrave à sua utilização no diagnóstico de rotina.

Neste sentido, a elaboração deste estudo teve como objetivo a obtenção e avaliação de um método serológico sensível, específico e de custo reduzido, que possa ser facilmente aplicável em rotina.

3.1. Objetivo Geral

- ◆ Produzir, *in house*, antígeno de *Toxocara canis* e avaliá-lo no imunodiagnóstico da LMV.

3.2. Objetivos Específicos

- ◆ Obter antígeno deslipidizado de larvas L2 de *Toxocara canis*;
- ◆ Avaliar o antígeno deslipidizado larvar de *Toxocara canis* no imunodiagnóstico da LMV pelo método de micro-ELISA na deteção de anticorpos IgG e IgG₄ contra o parasita, em comparação com o método de referência, o kit ELISA-IgG®;
- ◆ Determinar e comparar a especificidade e sensibilidade dos anticorpos IgG e do isótipo IgG₄ anti-*T. canis* no diagnóstico imunológico da LMV.

MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos

4.1. Antígeno deslipidizado (AgDs) de larvas L2 de *T. canis*

4.1.1. Obtenção de larvas L2 de *T. canis*

As larvas L2 foram obtidas *in vitro*, a partir de uma cultura de ovos de *T. canis* em formalina a 1%, durante 40 dias, a uma temperatura de 27°C, de acordo com o método usado por Reis *et al.* (2010) (Anexo 1), adaptado de De Savigny (1975) [28, 29].

De acordo com Chung *et al.* (2004), a formalina prolonga a viabilidade dos ovos de *T. canis*, sem que percam a infecciosidade e antigenicidade [44].

Os ovos foram retirados do útero das fêmeas de *T. canis*, recolhidas das fezes de cães infetados e previamente desparasitados com pamoato de pirantel (Strongid® Cães Pasta Oral, Pfizer Animal Health, USA). O princípio ativo deste anti-helmíntico, pamoato de pirantel, promove a paralisia do parasita e subsequente perda da capacidade de fixação ao lúmen intestinal, fazendo com que sejam eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro [29].

4.1.2. Obtenção do antígeno deslipidizado (AgDs) de larvas L2 de *T. canis*

A preparação de AgDs foi efetuada de acordo com a metodologia usada no laboratório de Helminologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (LHM/IHMT), adaptada de Benex (1974) e Golvan & Ambroise-Thomas (1984) [45, 46]. Assim, o AgDs de larvas L2 de *T. canis* foi produzido a partir do concentrado obtido na preparação do Ag total de larvas L2 (Anexo 2).

4.1.3. Determinação da concentração de proteína da preparação antigénica

A concentração de proteína do antígeno deslipidizado foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando o kit “Bio-Rad Protein Assay” (Anexo 3) [47].

4.1.4. Análise serológica

Os soros utilizados neste estudo foram enviados ao laboratório de Helminologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (LHM/IHMT), para diagnóstico serológico de toxocarose e outras helmintoses.

4.2. Técnicas imunológicas utilizadas no diagnóstico de rotina de LMV

4.2.1. *Macro-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Macro-ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) baseia-se no uso de antígenos ou anticorpos marcados com uma enzima de forma a detetar e quantificar os seus homólogos em amostras biológicas. Na deteção de anticorpos específicos anti-*T. canis* pelo macrométodo, as amostras de indivíduos com suspeita de LMV são incubadas em tubos de poliestireno revestidas com Ag E/S de larvas L2. Nas fases seguintes são adicionados um conjugado enzimático que irá reagir com o imunocomplexo antígeno-anticorpo formado e, um substrato enzimático específico que irá revelar a reação. O valor da densidade ótica do produto de reação, expresso como absorvância, permite quantificar os anticorpos específicos presentes na amostra [48].

4.2.2. Kit *Toxocara canis* IgG-ELISA Bioactiva Diagnostica (Kit ELISA-IgG®)

Este método é baseado na técnica de ELISA e considerado um dos métodos *gold standard* para o diagnóstico de *Toxocara canis* em soro e plasma humano.

O teste consiste em microplacas com 96 poços revestidos com Ag E/S larvar de *Toxocara canis* que, numa primeira fase são incubadas com os soros ou plasmas a testar previamente diluídos, e posteriormente é adicionado um conjugado enzimático. Se presente na amostra humana, o anticorpo IgG anti-*T. canis* irá reagir com o Ag E/S resultando na formação de um complexo antígeno-anticorpo-conjugado. Esta reação é revelada após a adição de um substrato específico, resultando na alteração da cor do complexo, e quantificável mediante a leitura da absorvância a 450 nm num

espectrofotómetro. A execução da técnica bem como a determinação do valor de *cut-off*, dado pela média dos valores de absorvância do controlo de *cut-off*, como a interpretação dos resultados, foram efetuadas de acordo com as instruções do fabricante. Assim, foram considerados positivos os soros com valores de absorvância 10% superiores ao valor de *cut-off*, enquanto os soros que obtiveram valores 10% inferiores foram dados como negativos. As amostras cuja absorvância se posicionou neste intervalo, *greyzone*, foram consideradas inconclusivas.

4.2.3. Técnica de Imunodifusão (ID)

Este método é usado na deteção de anticorpos anti-*T. canis* no soro humano dirigidos contra antígenos solúveis do parasita, resultando numa reação antígeno-anticorpo revelada pela formação de um precipitado.

A técnica, adaptada de Kagan & Norman (1963) consiste na difusão do antígeno e/ou anticorpo em lâminas de microscopia revestidas com gel de agarose e pode ser simples ou dupla [49]. Na imunodifusão simples, o antígeno ou o anticorpo permanecem fixados, verificando-se a difusão do outro até à formação do imunocomplexo e precipitação do mesmo. Na imunodifusão dupla, há o movimento tanto do antígeno como do anticorpo na direção um do outro, até à precipitação. Em ambos os casos, a difusão pode ser linear (unidimensional) ou radial (bidimensional).

4.2.4. Técnica de Imunoelectrodifusão (IED)

No método de IED, descrito por Rombert & Trinca (1976), a aplicação de um campo elétrico leva ao aumento da velocidade de precipitação do complexo antígeno-anticorpo, que é revelado através de coloração [50].

Este processo é realizado em gel de agarose, verificando-se a migração dos anticorpos do polo positivo (ânodo) para o polo negativo (cátodo) enquanto o antígeno migra no sentido inverso. Quando ambos reagem e ocorre a formação de um imunocomplexo verifica-se o aparecimento de bandas de precipitação.

4.3. Micro-Enzyme Linked Immunosorbent Assays (Micro-ELISA)

Nesta técnica imunológica, um dos componentes, antígeno ou anticorpo, é fixado sobre poços de microplacas de fundo plano e a formação do complexo antígeno-anticorpo-conjugado é revelada mediante a adição de um substrato específico. A reação pode ser visualizada devido à alteração da cor do imunocomplexo formado e é quantificada mediante uso de técnicas colorimétricas e espectrofotométricas.

O protocolo de micro-ELISA em uso no LHM/IHMT tem por base o método de Voller (1976), com algumas alterações (Anexo 4) [51].

4.3.1. Pesquisa de anticorpos IgG e IgG₄ anti-*T. canis* no soro humano pelo método de Micro-ELISA

Esta técnica foi utilizada para determinar e comparar a especificidade e sensibilidade dos anticorpos específicos IgG e IgG₄ anti-*T. canis* no diagnóstico imunológico da LMV, utilizando o antígeno deslipidizado de larvas L2 de *T. canis* (AgDs) produzido *in house* em relação aos métodos usados na rotina, em doentes suspeitos de infecção por *Toxocara* spp.

Utilizou-se ainda soros de indivíduos com outras parasitoses (filariose, fasciolose, schistosomose, hidatidose e cisticercose). A especificidade e sensibilidade, foram calculadas de acordo com Timmreck (1994) e Smith (1995) [52, 53].

Inicialmente, procedeu-se à determinação das diluições dos antígenos e soros a utilizar, bem como a concentração ótima dos antígenos e dos soros através da titulação com soros controlo (positivo e negativo).

O antígeno foi testado nas concentrações de 2 µg, 4 µg e 5 µg de proteína por mililitro (2µg/P/ml, 4µg/P/ml, 5µg/P/ml) e os soros nas diluições de 1:100, 1:200 e 1:400. Após otimização, a concentração estabelecida para o antígeno de *T. canis* foi de 5 µg/P/ml, e a diluição dos soros 1:200 (para a imunoglobulina IgG, Sigma) e 1:100 (para a imunoglobulina IgG₄, Sigma). O conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase foi usado na diluição de 1:20.000, enquanto a imunoglobulina anti-IgG₄ humana foi usada

numa diluição de 1:5000 quando conjugada com biotina e 1:2000 quando conjugada com peroxidase (ExtrAvidin-Peroxidase, Sigma).

Nas diferentes soluções utilizou-se um volume de 100 µl em cada poço da placa, com exceção do tampão de lavagem PBS/Tween (PBS com 0,05% Tween 20) e da solução bloqueadora da reação, HCl 2N, aplicados em volumes de 200 µl e 50 µl por poço, respetivamente. Os soros, amostras e controlos, foram testados em duplicado e calculada a média da absorvância das leituras de cada um.

As placas foram sensibilizadas com 100 µl de solução antigénica por poço (5 µg/ml) diluída em tampão carbonato pH 9,6 (15 mM NaCO₃, 35 mM NaHCO₃), durante 30 minutos numa estufa a 37°C e uma noite a 4°C.

Posteriormente, foram efetuadas quatro lavagens sucessivas das placas com tampão PBS/Tween (200 µl/poço) com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e, após secagem, procedeu-se ao bloqueio das mesmas com 2 % de albumina de soro bovino, Sigma (BSA) diluída em PBS/Tween. Após 1 hora e 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, procedeu-se a novas lavagens como anteriormente e, colocaram-se os soros nas diluições de 1/200 (para IgG) e 1/100 (para IgG₄) em PBS/Tween. Seguiram-se 2 horas de incubação à temperatura ambiente (TA) e posteriormente uma noite a 4°C. Após este tempo procedeu-se novamente a lavagens, seguindo-se a incubação das placas com os respetivos conjugados nas diferentes diluições em PBS/Tween durante 1 hora e 30 minutos à TA. Após a remoção do conjugado procedeu-se a novas lavagens com PBS/Tween. No caso do isótipo IgG₄, seguiu-se uma segunda incubação com ExtrAvidin-Peroxidase com posterior ciclo de lavagens.

Quando secas, as placas foram incubadas no escuro durante 30 minutos com o substrato cromogénico (9 mg de ortofenildiamina-OPD, em 25 ml de Tampão substrato (0,2 M Na₂HPO₄, 0,1 ácido cítrico, pH 5,5 e 25 µl de H₂O₂ a 30%), e posteriormente bloqueou-se a reação com 50 µl de HCl 2N.

A absorvância foi lida num espectrofotómetro (Anthos 2020) a um comprimento de onda de 492 nm. Após serem determinadas as densidades óticas, consideraram-se positivos os soros com valores de absorvância acima do *cut-off*. Este foi determinado pela média da leitura das densidades óticas dos controlos negativos (n=6) adicionada de três vezes o desvio padrão dos mesmos (X + 3SD).

4.4. Análise Estatística

Na análise estatística dos resultados utilizou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 25.0 para Microsoft Windows, para um nível de significância de 5%.

O teste de qui-quadrado (χ^2) de Pearson foi aplicado para avaliar o perfil de LMV em relação ao grupo etário e género. Utilizaram-se testes não paramétricos (*Kruskal-Wallis*) para avaliar o nível sérico de anticorpos (IgG e IgG₄) em relação ao estado de infeção.

O coeficiente de *Kappa* foi utilizado para averiguar o nível de concordância entre a ELISA *in house* e os métodos de rotina (Kit ELISA-IgG®, ID e IED).

Recorreu-se ao programa informático Microsoft Office Excel 2016 para a elaboração dos gráficos.

5

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Caracterização da amostra

Neste estudo foram utilizados 173 soros, dos quais 142 (82%) eram procedentes de indivíduos com suspeita de LMV, 25 (14%) de indivíduos com outras helmintoses e 6 (4%) de indivíduos normais (Figura 3).

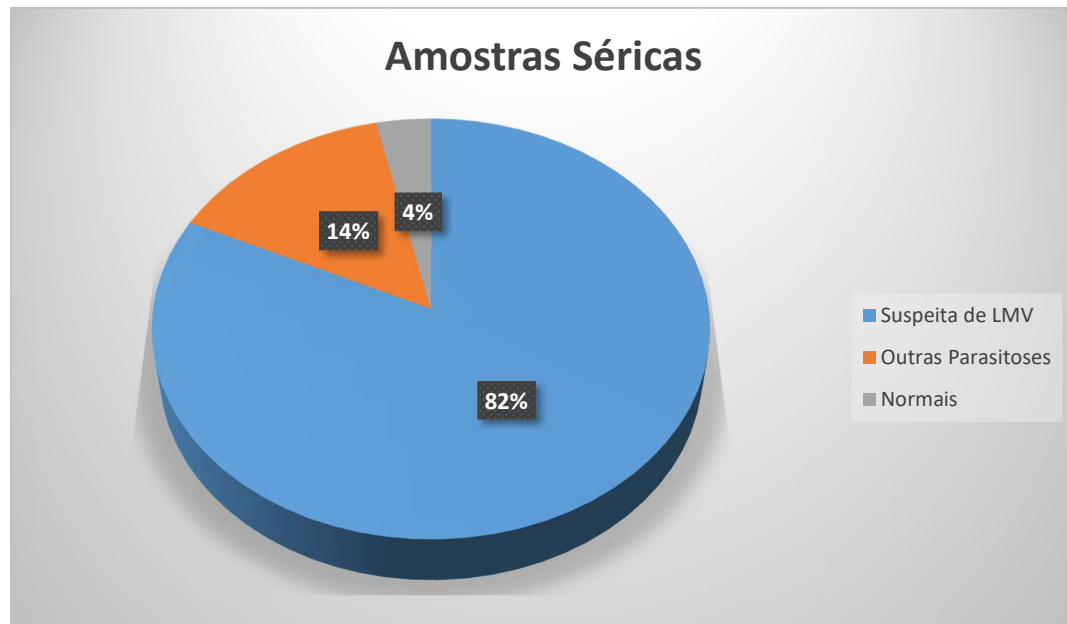


Figura 3. Amostras séricas enviadas para o LHM/IHMT.

Quanto ao perfil dos indivíduos com suspeita de LMV, 72 (50,7%) pertenciam ao género masculino, 68 (47,9%) ao feminino e em 2 das amostras (1,4%) esta informação não foi facultada. As idades estavam compreendidas entre 1 e 85 anos (Quadro 1).

Quadro 1: Perfil dos indivíduos avaliados.

Género			Idade		
Masculino % (n)	Feminino % (n)	Sem Registo % (n)	Média (±SD)	Máxima	Mínima
50,7% (72)	47,9% (68)	1,4% (2)	23,61 (±20,935)	85	1

5.2. Resultado dos métodos utilizados no diagnóstico de rotina

Todos os soros foram analisados pelos métodos utilizados na rotina do LHM/IHMT, nomeadamente: as técnicas de precipitação, imunodifusão (ID) e imunoelectrodifusão (IED) em gelose, utilizando-se antígeno total de *T. canis*, e o kit ELISA-IgG® (Bioactiva Diagnostica).

5.2.1. Comparação do resultado do Kit ELISA-IgG® com as provas precipitação

Das 142 amostras com suspeita de LMV avaliadas, 16 (11,3%) obtiveram um resultado positivo pelo método de ID e 126 (88,7%) um resultado negativo. Pelo método de IED, o número de soros positivos foi de 115 (81%) enquanto os negativos foram 27 (19%).

Quando analisados com o kit ELISA-IgG®, 84 (59,2%) confirmaram ser positivos, enquanto 13 (9,2%) se posicionaram na *greyzone*, tendo por isso um resultado inconclusivo. Os soros com um diagnóstico negativo para LMV foram 45 (31,7%) (Figura 4).

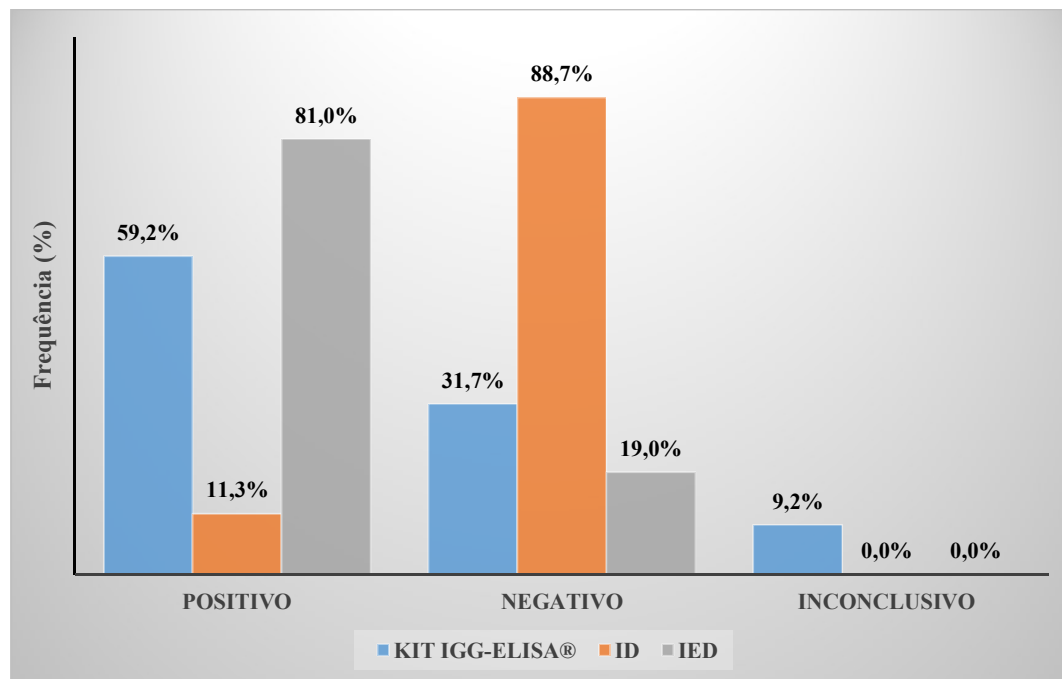


Figura 4. Resultado dos diferentes métodos usados em rotina, Kit ELISA-IgG®, ID e IED.

Assim, em comparação com o kit ELISA-IgG®, as provas de ID e IED obtiveram sensibilidades de 14,3% e 89,2%, respectivamente (Figura 5).

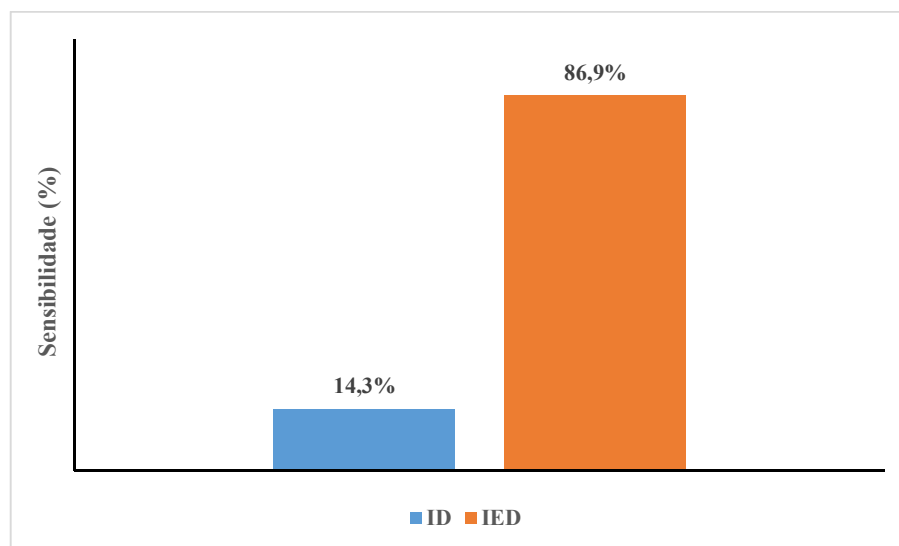


Figura 5. Sensibilidade das provas de precipitação.

5.3. Avaliação do antígeno deslipidizado de larvas L2 de *T. canis* (AgDs)

O antígeno em estudo, AgDs de larvas L2 de *Toxocara canis*, foi preparado de acordo com a metodologia usada no LHM/IHMT, e a sua concentração proteica, 742 µg/P/ml, determinada através da comparação com a curva padrão pelo método de Bradford (1976).

5.3.1. Sensibilidade e especificidade do AgDs

Quando testado nas amostras com outras helmintoses (n=25), o AgDs registou uma especificidade de 72% no teste ELISA-IgG, verificando-se reações cruzadas com soros de 7 indivíduos, enquanto no teste de ELISA-IgG₄ o número de reações cruzadas foi igual a 5, obtendo uma especificidade de 80% (Figura 6).

Quanto à sensibilidade, o antígeno avaliado (AgDs) apresentou um valor de 42,9% na deteção de anticorpos IgG, sendo de 22,6% para IgG₄, quando testado nas amostras com suspeita de LMV (n=142) em comparação com o kit ELISA-IgG® (Figura 6).

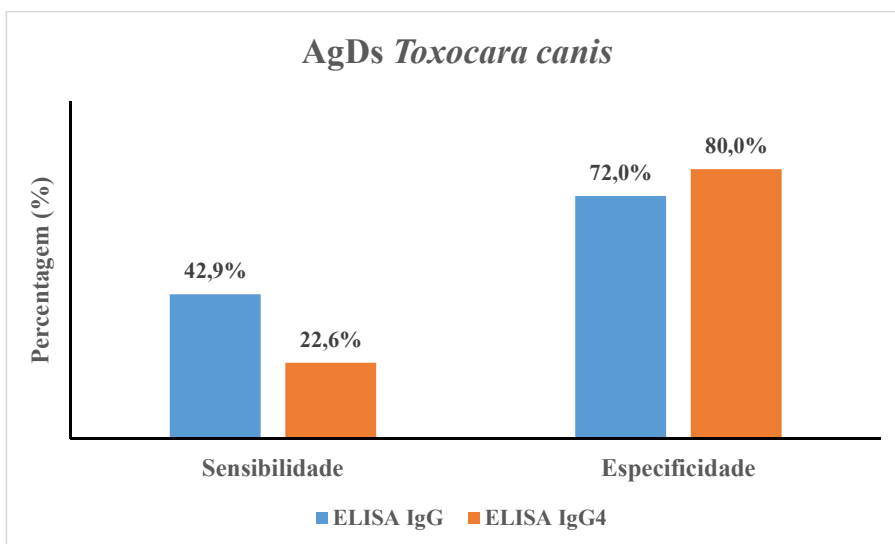


Figura 6. Sensibilidade e especificidade do AgDs de larvas L2 de *T. canis* pelo método de ELISA, na deteção de anticorpos IgG e IgG₄.

5.3.2. Comparação das reações cruzadas obtidas na ELISA *in house* (ELISA-IgG e ELISA-IgG4) com o Kit ELISA-IgG®

O antígeno de excreção/secreção de larvas L2 de *T. canis* (Ag E/S), usado no kit ELISA-IgG®, apresentou uma especificidade de 76%, verificando-se reações cruzadas em uma das amostras provenientes de indivíduos com fasciolose (n=2), em duas das 7 amostras com filariose linfática e em 3 soros dos 6 indivíduos parasitados com *Schistosoma* spp. (Figura 7). O AgDs utilizado na ELISA *in house* registou reações cruzadas com todos os helmintas testados para IgG e, em relação ao anticorpo IgG4, esta reatividade cruzada apenas não se verificou nos soros de indivíduos com cisticercose (Figura 7).

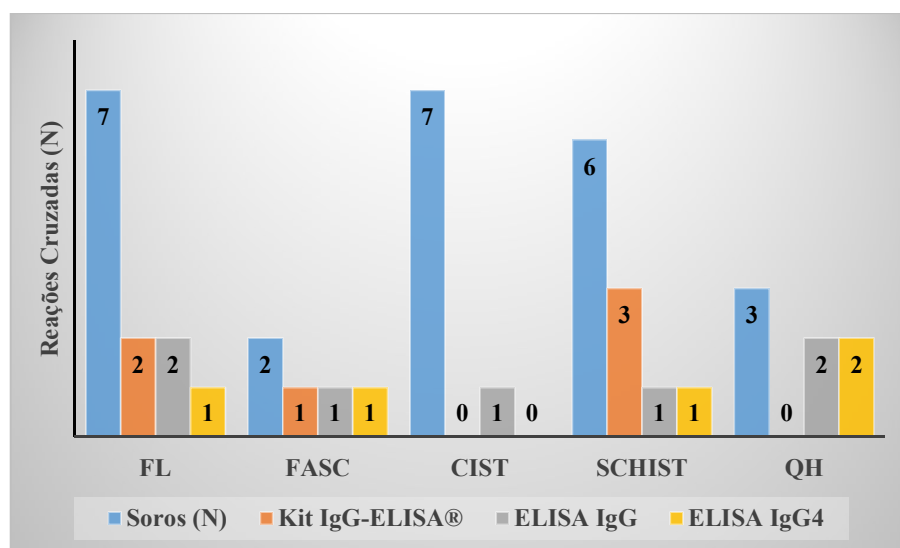


Figura 7. Reações cruzadas registadas nos três testes usados - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG4, quando testados com soros de indivíduos com outras helmintoses. **FL** – Filariose Linfática, **FASC** – Fasciolose, **CIST** – Cisticercose, **SCHIST** – Schistosomose, **QH** – Hidatidose.

5.3.3. Comparação dos resultados obtidos na ELISA *in house* (ELISA-IgG e ELISA-IgG4) com os métodos usados no diagnóstico de rotina

Relativamente ao teste de ELISA, dos 142 soros com suspeita de LMV analisados, 50 (35,2%) tinham níveis de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. superiores ao limiar de positividade com o antígeno deslipidizado (AgDs) e apenas 27 (19%) tinham valores positivos para anticorpos IgG₄ com o mesmo antígeno. Quanto ao Ag E/S usado no kit ELISA-IgG®, verificou-se níveis de anticorpos IgG superiores ao limiar de positividade em 84 soros (59,2%) (Figura 8).

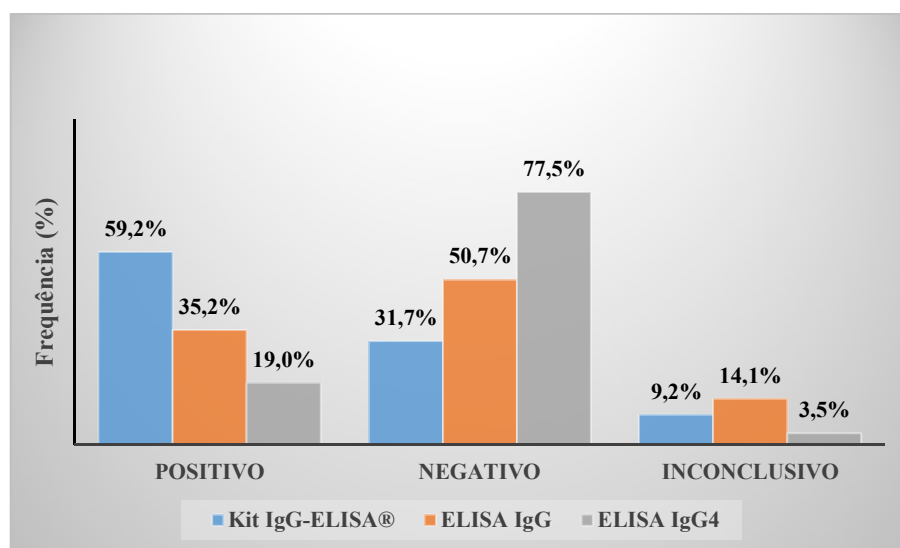


Figura 8. Resultado do rastreio de LMV obtido pelo método de ELISA - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG₄.

Quanto às provas de precipitação, a IED registou 115 (81%) amostras positivas para o antígeno total de *Toxocara* spp., havendo apenas 16 (11,3%) indivíduos com serologia positiva na ID (Figura 9).

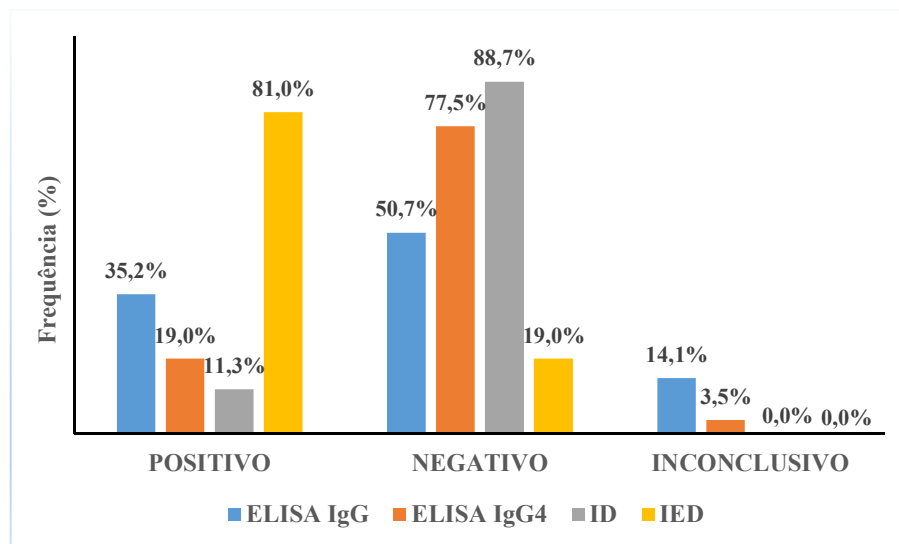


Figura 9. Resultado do rastreio de LMV obtido pelo método de ELISA *in house* - ELISA-IgG e ELISA-IgG₄, e provas de precipitação – ID e IED.

O antígeno em estudo (AgDs), demonstrou uma concordância significativa com o kit de referência (kit ELISA-IgG®) no teste de micro-ELISA apenas na detecção de anticorpos IgG ($Kappa=0,168$; $p-value<0,05$) (Quadro 2).

Quadro 2. Níveis de concordância (Fator *Kappa*) obtido entre o Kit ELISA-IgG® e os testes ELISA-IgG, ELISA-IgG₄ e provas de precipitação – ID e IED.

	Kit ELISA-IgG®			<i>Kappa</i>	<i>p</i>
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	Inconclusivo N (%)		
AgDs IgG	36 (42,9%)	30 (66,7%)	3 (23,1%)	0,168	0,005 * $p<0,05$
AgDs IgG₄	19 (22,6%)	30 (66,7%)	0	0,052	0,283 ** $p>0,05$
ID	12 (14,3%)	41 (91,1%)	0	0,039	0,294 ** $p>0,05$
IED	73 (86,9%)	14 (31,1%)	0	0,159	0,015 * $p<0,05$

*Diferenças estatisticamente significativas; **Sem diferenças estatisticamente significativas.

5.3.4. Comparação dos níveis séricos de anticorpos (Ac) anti-*Toxocara canis* em soros de indivíduos com suspeita de LMV

O Quadros 3 e 4 representam a distribuição dos *scores* das densidades óticas dos indivíduos suspeitos de LMV (n=142) com serologia positiva e inconclusiva para LMV, respetivamente, quando testados nos diferentes testes de micro-ELISA para os antígenos deslipidizado (AgDs) e de excreção/secreção (Ag E/S) de *Toxocara canis*, na deteção de anticorpos IgG e IgG₄.

Quadro 3. Níveis séricos de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em indivíduos com serologia positiva na micro-ELISA - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG₄.

Ag	Teste-Atc	Mínimo	Máximo	Mediana	Desvio-Padrão	IC 95%
Ag E/S	Kit ELISA-IgG®	0,532	3,112	1,251	0,0762	1,223-1,529
AgDs	ELISA-IgG	0,194	1,772	0,243	0,333	0,284-0,473
AgDs	ELISA-IgG ₄	0,105	2,402	0,212	0,635	0,229-0,731

Quadro 4. Níveis séricos de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em indivíduos com serologia inconclusiva na micro-ELISA - Kit ELISA-IgG®, ELISA-IgG e ELISA-IgG₄.

Ag	Teste-Atc	Mínimo	Máximo	Mediana	Desvio-Padrão	IC 95%
Ag E/S	Kit ELISA-IgG®	0,426	0,523	0,475	0,007	0,456-0,490
AgDs	ELISA-IgG	0,162	0,188	0,174	0,007	0,171-0,178
AgDs	ELISA-IgG ₄	0,089	0,102	0,096	0,005	0,089-0,102

As Figuras 10, 11 e 12 ilustram a distribuição dos valores de densidade ótica obtidos em todos os soros de indivíduos com suspeita de LMV, quando testados com os diferentes testes de micro-ELISA. As densidades óticas dos soros positivos foram significativamente mais elevadas (Kruskall-Wallis, $p \approx 0,000 < 0,05$) do que os valores dos soros negativos e inconclusivos, em todos os testes de micro-ELISA.

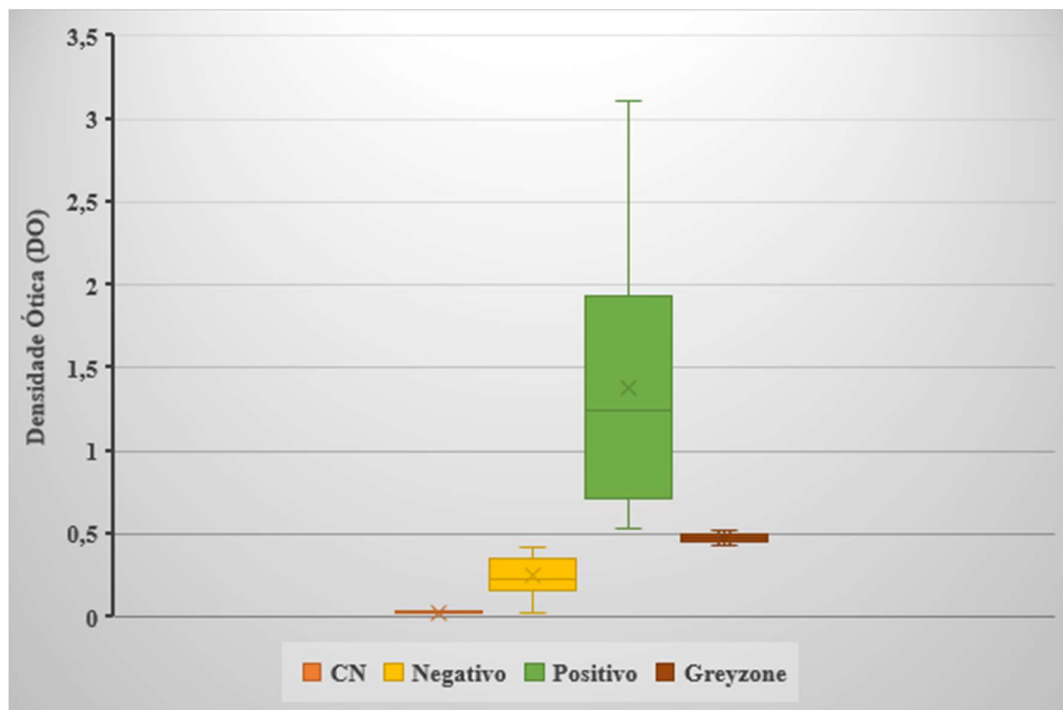


Figura 10. Diagrama de extremos e quartis dos scores das densidades óticas do Ag E/S obtido pelo método Kit ELISA-IgG®, quando testado para o anticorpo IgG anti-*Toxocara* spp.

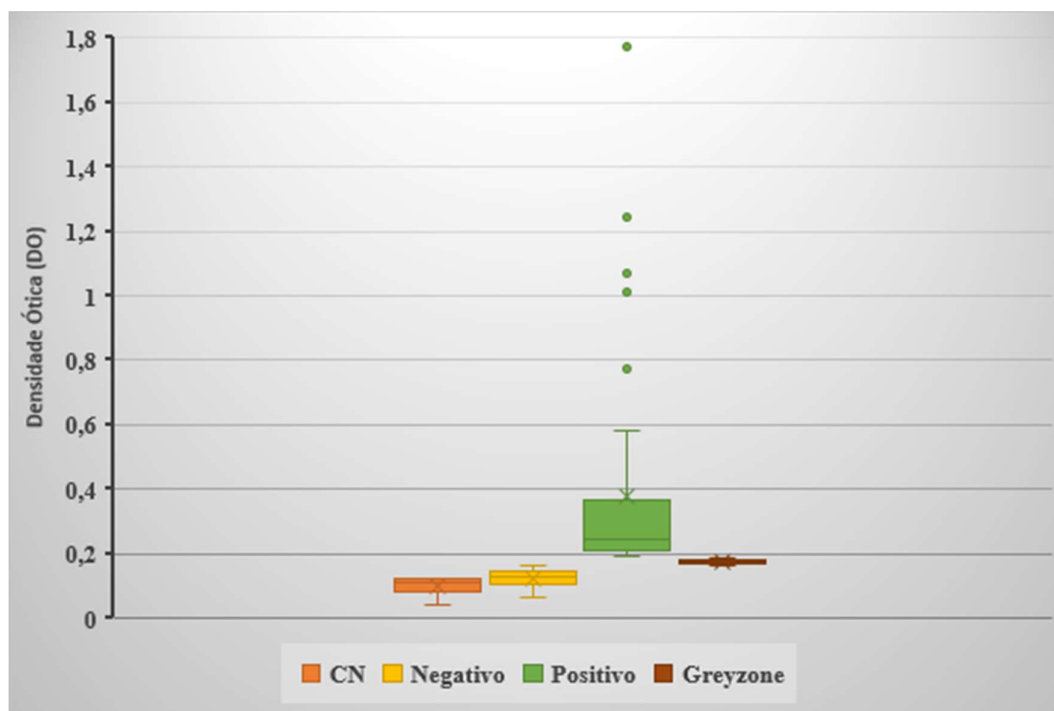


Figura 11. Diagrama de extremos e quartis dos scores das densidades óticas do AgDs obtido pelo método ELISA-IgG, quando testado para o anticorpo IgG anti-*Toxocara* spp.

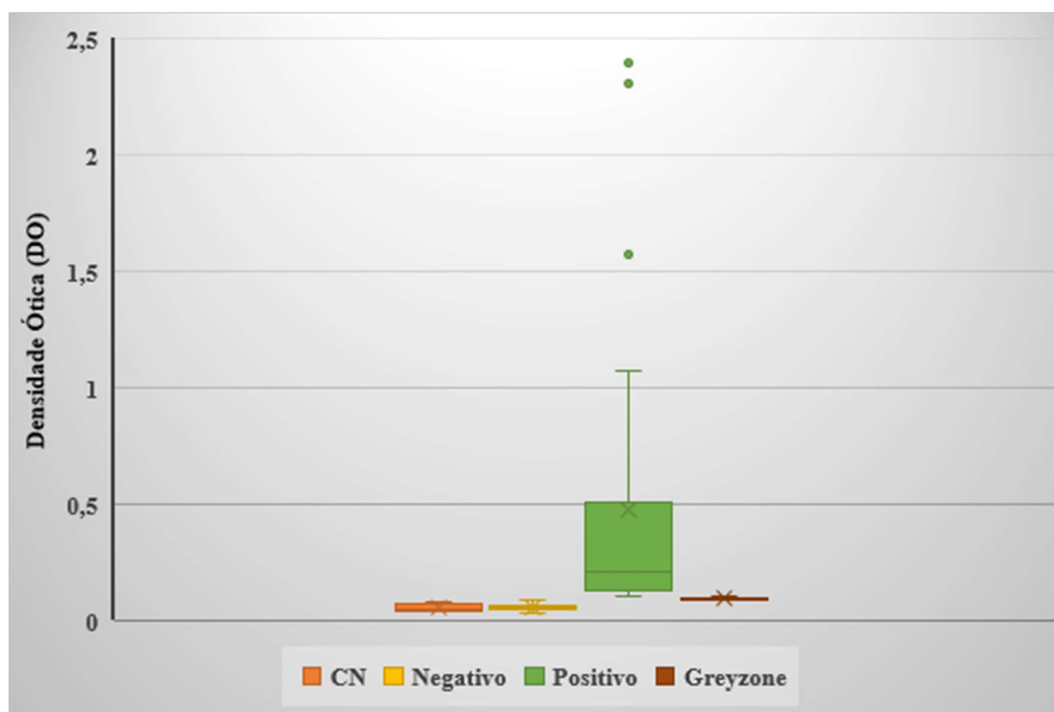


Figura 12. Diagrama de extremos e quartis dos scores das densidades óticas do AgDs obtido pelo método ELISA-IgG₄, quando testado para o anticorpo IgG₄ anti-*Toxocara* spp.

5.3.5. Perfil dos indivíduos com serologia positiva para LMV nos testes de Micro-ELISA

Das 84 amostras positivas para LMV com o kit ELISA-IgG®, 51 eram do género masculino (60,7%), 32 do feminino (38,1%) e em um dos soros (1,2%) o sexo do indivíduo não foi facultado, verificando-se diferenças estatisticamente significativas (χ^2 , $p \approx 0,008 < 0,05$) na distribuição da infeção em relação ao género. Nos testes de ELISA-IgG (χ^2 , $p \approx 0,906 > 0,05$) e ELISA-IgG₄ (χ^2 , $p \approx 0,098 > 0,05$), o número de casos positivos para LMV não apresentaram diferenças significativas entre géneros (Figura 13).

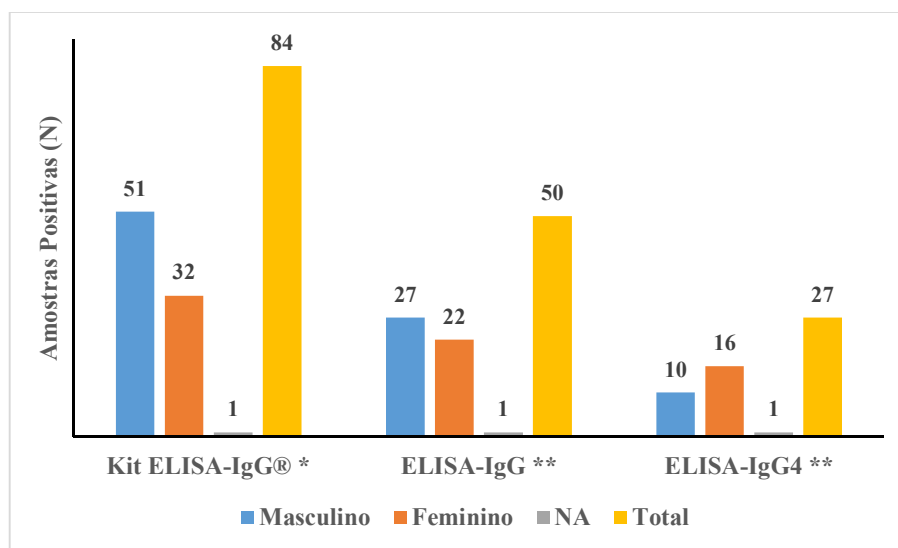


Figura 13. Distribuição do género dos indivíduos com serologia positiva para LMV, nos diferentes testes de micro-ELISA. NA – Não Apresentado. *Diferenças estatisticamente significativas; **Sem diferenças estatisticamente significativas.

No que respeita à distribuição da infeção por LMV nos diferentes grupos etários, os indivíduos com idades entre os 1 e 10 anos revelaram o maior número de soros positivos em todos os testes de micro-ELISA, contudo as diferenças não apresentaram significado estatístico (Kit ELISA-IgG® - χ^2 , $p \approx 0,115 > 0,05$; ELISA-IgG - χ^2 , $p \approx 0,128 > 0,05$; ELISA-IgG₄ - χ^2 , $p \approx 0,255 > 0,05$) em relação aos grupos de idade superior (Figura 14).

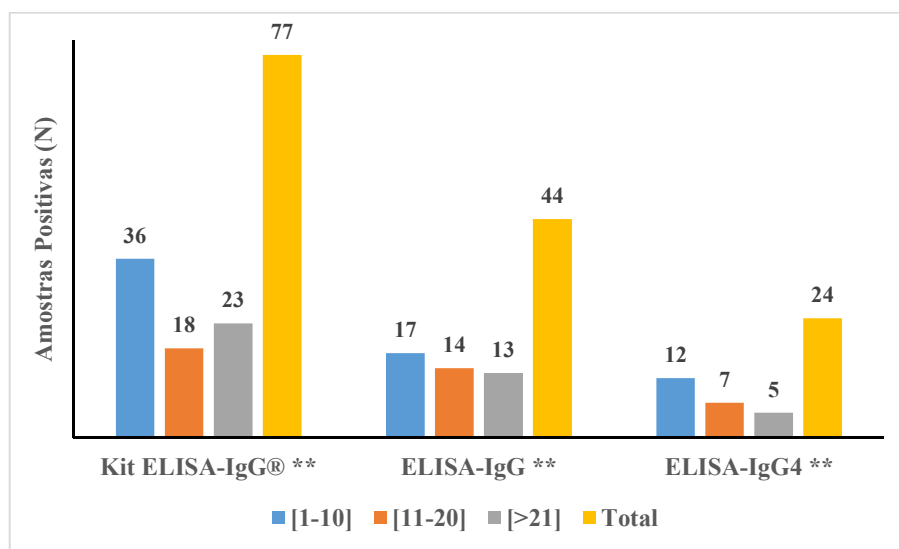


Figura 14. Distribuição dos grupos etários dos indivíduos com serologia positiva para LMV, nos diferentes testes de micro-ELISA. **Sem diferenças estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

6. Discussão e Conclusões

Desde os estudos de Wilder (1950) e Beaver et. al (1952), que permitiram identificar o agente causador da doença, que a LMV tem vindo a ser reportada por todo mundo, sendo reconhecida como um importante problema de saúde pública [18].

A maioria dos casos de infecção humana têm sido reportados em crianças, o principal grupo de risco, e associada à ingestão accidental de ovos embrionados presentes em solos contaminados com fezes de animais parasitados, bem como à posse e contato próximo com animais de estimação e hospedeiros definitivos de *Toxocara* spp. [2, 5]. Nos adultos, a prevalência de taxas altas de anticorpos anti-*Toxocara* spp., tem também vindo a ser associada a hábitos de consumo de carne e vísceras insuficientemente cozinhadas de outros hospedeiros paraténicos infetados [2, 54].

Em Portugal, os estudos realizados sobre seroprevalência apontam para valores entre os 6,25%, registado em crianças com diagnóstico de pericardite aguda, e 17,7% em indivíduos residentes no concelho de Santa Maria da Feira [55, 56]. Este último estudo, publicado em 1998, registou uma seropositividade mais elevada em indivíduos adultos com idade superior a 60 anos (47%), associada ao contato com animais de companhia, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre géneros [56].

Atualmente, de acordo com a casuística do LHM/IHMT, a toxocarose é a parasitose mais solicitada para diagnóstico, principalmente pelos clínicos da região de Lisboa, tendo sido detetados 125 casos (29,4%) de 425 suspeitos no período de 2012-2016 (Silvana Belo, informação pessoal).

Os métodos de diagnóstico serológico utilizados diferem entre os estudos, referindo as técnicas de *enzyme immunoassay* (EIA), imunoblotting (*Western Blot*, WB) imunoelectrodifusão (IED) e micro-ELISA [56, 57, 58].

O teste de micro-ELISA usado na deteção de anticorpos anti-*T. canis*, que consiste no uso do Ag E/S de larvas L2 obtido pelo método de De Savigny (1975), tem vindo a ser considerado o método imunológico de referência no diagnóstico de rotina de LMV, apesar da reatividade cruzada com anticorpos gerados por outras infeções helmínticas [12, 28, 59]. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention*, a sensibilidade do teste corresponde a 78%, sendo superior a 90% em especificidade [60]. No entanto, estes valores revelam ser variáveis entre estudos, dependendo do *cut-off* usado [59, 61]. Glickman et al. (1978), referem um valor de sensibilidade de 78,3% e

92,3% de especificidade do Ag E/S de *T. canis* no teste de ELISA, sendo de 80% e 93%, respetivamente, de acordo com Speiser & Gottstein (1984) [62, 63].

No estudo de Wijesundera *et al.* (2003), os soros positivos para o Ag E/S de *T. canis* no teste de ELISA, registaram 25% de reações cruzadas com o Ag de *T. vitulorum* e nenhuma reatividade com os antígenos de *Ascaris lumbricoides* e *Necator americanus*, enquanto Jaquier *et al.* (1991), obtiveram 91% de sensibilidade e 86% de especificidade no kit Biokema-Affinity Products (Crissier-Lausanne, Switzerland), ao registar reações cruzadas com soros de indivíduos com outras helmintoses (triquinelose, strongiloidose, e fasciolose) na deteção de Ac IgG anti-*T. canis* [61, 64].

Apesar dos avanços na metodologia de diagnóstico desta zoonose, no sentido de ultrapassar as questões relacionadas com a falta de especificidade associada à homologia antigénica entre nemátodes, há aspetos que dificultam a sua aplicabilidade em rotina laboratorial, nomeadamente a morosidade e custo elevado associados à técnica de WB [7, 19].

Na perspetiva de contribuir para a melhoria do diagnóstico imunológico da LMV, bem como minimizar os custos associados à aquisição dos kits comerciais utilizados, neste estudo foi avaliado o antígeno deslipidizado de larvas L2 de *Toxocara canis* produzido *in house*, na deteção de Ac IgG e IgG₄ anti-*Toxocara* spp. pelo método de micro-ELISA, e comparado com o teste de referência, o kit *Toxocara canis* IgG-ELISA, Bioactiva Diagnostica (kit ELISA-IgG®). As amostras estudadas dizem respeito a indivíduos com suspeita de LMV, cujos soros foram enviados para o LHM/IHMT para o diagnóstico desta e de outras helmintoses.

Com base nos resultados deste estudo, constatou-se que a sensibilidade da preparação antigénica deslipidizada (AgDs) foi inferior à do teste de referência (kit ELISA-IgG®), sendo de 42,9% e de 22,6% quando testada na deteção de anticorpos IgG e IgG₄, respetivamente (Figura 6). Quanto à especificidade, o valor registado com o antígeno em estudo na deteção de anticorpos IgG foi inferior ao obtido no kit ELISA-IgG® (72% e 76%, respetivamente), revelando ser superior na deteção de IgG₄ (80%) (Figuras 6 e 7). Em relação ao AgDs de larvas L2 de *T. canis*, parece não ser alvo de investigações recentes, uma vez que não foram encontrados trabalhos relacionados com este antígeno na revisão de literatura efetuada, não sendo possível comparar os resultados obtidos com outros estudos. No entanto, a presença de lípidos no produto de excreção/secreção de

larvas de *T. canis* foi demonstrada por Niedfeld *et al.* (1993), tal como ácidos gordos com funções importantes na relação parasita-hospedeiro [65]. À semelhança do que acontece com outros parasitas, a componente lipídica presente no antígeno de larvas L2 de *T. canis* poderá estar na origem das reações cruzadas entre infeções helmínticas, dado a importância que estas moléculas desempenham na regulação enzimática, reconhecimento e interação celular, bem como na regulação da expressão génica [66, 67]. Para além destes aspetos, há a considerar a possível infeção por outros Ascaridida, nomeadamente *T. cati* e *A. suum*, cuja prevalência nos animais domésticos (gatos e suínos) tem vindo a aumentar de modo significativo, o que poderá contribuir para infeções humanas não diagnosticáveis pelos antígenos produzidos pelas larvas L2 de *T. canis*. Adicionalmente, há a considerar o papel que os animais silvestres poderão desempenhar na transmissão de *T. canis* e *A. suum*, uma vez que constituem reservatórios destes parasitas.

Em relação ao kit ELISA-IgG®, o fabricante refere uma especificidade do antígeno superior a 95%, não excluindo a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada com anticorpos anti-*A. lumbricoides* e anti-*Schistosoma* spp. As reações cruzadas registadas neste estudo ocorreram com soros de indivíduos com filariose e schistosomose, já descrita na literatura como particularmente comum em regiões tropicais, e fasciolose [13, 14]. No entanto, a globalização e o livre tráfego de pessoas dos dias de hoje, bem como o desconhecimento da naturalidade e história da população estudada não permite inferir se as reações cruzadas obtidas neste estudo, tanto com o Ag E/S como com o AgDs, são resultado da existência de epítomos antigénicos comuns entre os helmintas.

Quanto à deteção concomitante de anticorpos IgG e IgG₄ anti-*Toxocara* spp. dirigidos ao AgDs, os resultados obtidos estão de acordo com os estudos de Nordin *et al.* (2005), ao ser registado um valor de especificidade mais elevado na deteção do isótipo IgG₄ em comparação com a IgG [13]. No entanto, não se pode concluir que a elevação de ambos os parâmetros seja indicativa de uma infeção ativa, dada a ausência de significado estatístico relativa ao nível de concordância entre os resultados obtidos na ELISA *in house* e no teste de referência (Quadro 2) [13, 14].

No que respeita ao perfil dos indivíduos seropositivos para LMV deste estudo, à semelhança do descrito por Carvalho & Rocha (2011) e Oryan & Alidadi (2015), a distribuição da infeção no género masculino (68,7%) registou um valor superior ao feminino (38,1%) no método de diagnóstico de referência, apresentando diferenças com

significado estatístico (χ^2 , $p \approx 0,008 < 0,05$) (Figura 13) [5, 41]. Em relação ao grupo etário, a maior percentagem de infeção registada nos indivíduos entre 1 e 10 anos de idade corrobora vários estudos em que a prevalência da infeção foi superior em crianças até aos 12 anos, contudo não apresentou diferenças com significado estatístico em relação aos grupos com idade superior (χ^2 , $p \approx 0,115 > 0,05$) (Figura 14) [5, 18, 19, 41, 42, 56].

Com base nos resultados deste e de outros estudos, pode constatar-se que a toxocarose humana afeta indivíduos de todas as idades, independentemente do *status* e nível de desenvolvimento da sociedade, sendo importante não só a sensibilização dos clínicos para a sintomatologia associada às diferentes síndromes clínicas da doença, como da população com animais de companhia. A prevenção desta zoonose está ao alcance de todos, desde que adotadas as medidas adequadas de cuidados veterinários e de higiene, quer pessoal, como do animal de estimação e do meio ambiente.

Quanto à pretensão de melhoria do imundiagnóstico da LMV, este trabalho veio realçar a fragilidade dos métodos aplicados em rotina e a importância da utilização de mais do que uma técnica serológica para um diagnóstico mais preciso. Por outro lado, vem reforçar a necessidade de investigação, sobretudo a nível da caracterização antigénica de *Toxocara* spp., com vista à obtenção de preparações antigénicas, tais como proteínas recombinantes, de maior especificidade.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

- 1- Overgaauw P.A.M., Knapen F.V., (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp., *Veterinary Parasitology* 193, 398– 403.
- 2- Iowa State University Center for Food Security and Public Health, "Toxocariasis" (2016). *Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets* 134. Acedido em 15 de Fevereiro de 2017, em: http://lib.dr.iastate.edu/cfsph_factsheets/134.
- 3- Le T.H., Anh N.T.L., Nguyen K.T., Nguyen N.T.B., D.T.T. Thuy, Gasser R.B. (2016). *Toxocara malaysiensis* infection in domestic cats in Vietnam — An emerging zoonotic issue? *Infection, Genetics and Evolution* 37, 94–98. Acedido em 15 de Fevereiro de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.009>.
- 4- Maizels R.M., (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion, *Veterinary Parasitology* 193, 365– 374;
- 5- Carvalho E. A. A., Rocha R. L., (2011). Toxocariasis: visceral larva migrans in children, *Jornal de Pediatria* 87 (2), 100–110.
- 6- Woodhall D.M.D, Starr M.C.B., Montgomery S.P., Jones J.L., (2012). Ocular Toxocariasis: Epidemiologic, Anatomic, and Therapeutic Variations Based on a Survey of Ophthalmic Subspecialists, *The American Academy of Ophthalmology* 119 (6), 1211–1217. Acedido em 16 de Fevereiro de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.opthta.2011.12.013>.
- 7- Nguyen H.H., Vo D.T., Thai T.T.T., Le T.T.T., Le T.D., Hoang N.S., (2017). The 33.1 kDa Excretory/secretory Protein Produced by *Toxocara canis* Larvae Serves as a Potential Common Biomarker for Serodiagnosis of Toxocariasis in Paratenic Animals and Human, *Iranian Journal of Parasitology*, 12 (1), 69-82;
- 8- Zhu X.Q., Korhonen P.K., Cai H., Young N.D., Nejsun P., Samson-Himmelstjerna G.V., Boag P.R., Tan P., Li Q., Min J., Yang Y., Wang X., Fang X., Hall R.S., Hofmann A., Sternberg P.W., Jex A.R., Gasser R.B., (2015). Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*, *Nature communications*, 2, 1–8. Acedido em 18 de Fevereiro de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7145>.

- 9- Hombu A, Yoshida A., Kikuchi T., Nagayasu E., Kuroki M., Maruyama H., (2017). ScienceDirect, Treatment of larva migrans syndrome with long-term administration of albendazole, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1-6. Acedido em 20 de Fevereiro de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.002>;
- 10- Ecevit Ç., Bağ Ö., Vergin C., Öztürk A., (2012). Visceral Larva Migrans Presenting with Hypereosinophilia, Clinic of Pediatric, Behçet Uz Children's Diseases and Surgery Training and Research Hospital, İzmir, Turkey, 58-60;
- 11- Schneider R., Herbert Auer H., (2015). Incidence of *Ascaris suum*-specific antibodies in Austrian patients with suspected larva migrans visceralis (VLM) syndrome, *Parasitology Research*. Acedido em 1 de Março de 2017, em: <https://www.researchgate.net/publication/285752247>;
- 12- Wilkins P.P., (2014). Immunodiagnosis of Human Toxocariasis and Prospects for Improved Diagnostics, *Current Tropical Medicine Reports*, 1:44–51, Acedido em 1 de Março de 2017, em: https://www.researchgate.net/publication/272014059_Immunodiagnosis_of_Human_Toxocariasis_and_Prospects_for_Improved_Diagnostics.
- 13- Noordin R., Smith H.V., Mohamada S., Maizels R.M., Fongd M.Y., (2005). Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis, *Acta Tropica* 93, 57–62.
- 14- Fillaux J., Magnaval J.F., (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis, *Veterinary Parasitology*, 193, 327– 336.
- 15- Myers, P., Espinosa R., Parr C.S., Jones T., Hammond G.S., Dewey T.A., (2017). The Animal Diversity Web (online). Acedido em 22 de Fevereiro de 2017, em: <http://animaldiversity.org>.
- 16- Harris-Linton M., (2001). "*Toxocara canis*" (On-line), Animal Diversity Web. Acedido em 22 de Fevereiro de 2017, em: http://animaldiversity.org/accounts/Toxocara_canis/.

- 17- Webster G.A., (1958). A Report on *Toxocara canis* Werner, 1782. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 22(8), 272–279. Acedido em 22 de Fevereiro de 2017, em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1614637/pdf/vetsci00345-0022.pdf>.
- 18- Despommier D., (2003). Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology and Molecular Aspects, *Clinical Microbiology Reviews* 16(2), 265–272. Acedido em 5 de Março de 2017, em: <http://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>.
- 19- Fan C.K., Liao C.W., Cheng Y.C., (2013). Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment, *Veterinary Parasitology* 193, 342–352.
- 20- Schoenardie E.R., Scaini C.J., Pepe M.S., Borsuk S., Costa de Avila L.F., Villela M.; Berne M.E.A., (2013). Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 22(4), 623–626. Acedido em 5 de março de 2017, em: <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000400030>.
- 21- Fan C.K., Holland C.V., Loxton K., Barghouth U., (2015). Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders? *Clinical Microbiology Reviews* 28 (3).
- 22- Magnaval J.F., Glickman L.T., Dorchies P., Morassini B., (2001). Highlights of human toxocariasis, *The Korean Journal of Parasitology* 39(1), 1–11.
- 23- Moore T.A, McCarthy J.S., (2006). Toxocariasis and larva migrans syndromes, Guerrant RL, Walker DH, Weller PF (Editors). *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.;
- 24- Pinelli E., Roelfsema J.H., Brandes S., Kortbeek T., (2013). Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR, *Veterinary Parasitology* 193 (4) 337–341. Acedido em 5 de Março de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.029>.

- 25- Lee K.H., Kim T.J., Lee K.W., (2015). Pulmonary Toxocariasis: Initial and Follow-Up CT Findings in 63 Patients, *American Journal of Roentgenology* 204:1203-1211. Acedido em 5 de Março de 2017, em: <http://www.ajronline.org/doi/abs/10.2214/AJR.14.13700>.
- 26- Chang S., Lim J.H., Choi D., Park C.K., Kwon N.H., Cho S.Y., Choi D.C., (2006). Hepatic Visceral Larva Migrans of *Toxocara canis*: CT and Sonographic Findings, *American Journal of Roentgenology* 187 (6), 622-629. Acedido em 2 de Abril de 2017, em: http://www.ajronline.org/doi/full/10.2214/AJR.05.1416#_i1.
- 27- Park B.M., Jeong S.O., Park H.S., Jung S.S., Kim S.Y., Kim J.O., Lee J.E., (2014). Differences in the clinical and radiological characteristics of lung-involved toxocariasis between toxocariasis with eosinophilia and those without eosinophilia, *Journal of Thoracic Disease* 6(3), 1757–1764. Acedido em 12 de Abril de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.12.24>.
- 28- De Savigny D. H., (1975). *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Journal of Parasitology* 61: 781-782;
- 29- Reis M., Trinca A., Ferreira M.J.U., Monsalve-Puello A.R., Grácio M.A.A., (2010). *Toxocara canis*: Potential activity of natural products against second-stage larvae in vitro and in vivo, *Experimental Parasitology* 126(2), 191-197. Acedido 21 de Abril de 2017, em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489410001402>.
- 30- Smith H., Noordin R., (2006). Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis, Holland, C.V., Smith, H.V. (Editors), *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 89–112;
- 31- Rodríguez-Caballero A., Martínez-Gordillo M.N., Medina-Flores Y., Medina-Escutia M.E., Meza-Lucas A., Correa D., Caballero-Salazar S., Ponce-Macotella M., (2015). Successful capture of *Toxocara canis* larva antigens from human serum samples, *Parasites & Vectors* 8:264. Acedido em 30 de Abril de 2017, em: <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0875-5>.

- 32- Schoenardie E.R., Scaini C.J., Avila L.F.C., Sperotto R.L., Borsuk S., Felicetti C.D.P., Pires C.D., Pepe M., Berne, M.E.A. (2014). Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23(3): 403-406. Acedido em 5 de Maio de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014060>.
- 33- Borecka A., (2013). Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens, *Toxocara*, CRC Press, Francis and Taylor Group, 13:978-1-4398-1243-3, Boca Raton, 681-690;
- 34- Macpherson C.N., (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance, *International Journal for Parasitology* 43(12-13), 999-1008. Acedido em 10 de Maio de 2017, em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954435>.
- 35- Fernando S.D., Wickramasinghe V.P., Dewasurendra R.L., Kapilananda G.M.G., (2011). Comparative effect of albendazole and diethylcarbamazine in the treatment of toxocariasis in children from Sri Lanka: A preliminary study, *Journal of Clinical Medicine and Research* 3(3), 46. Acedido em 12 de Maio de 2017, em: <http://www.academicjournals.org/JCMR>.
- 36- WHO (1999). WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in HIV-Related Infections, Albendazole. Acedido em 29 de Maio de 2017, em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2215e/9.2.html>.
- 37- Prichard R. K., (2007). Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? *Parasitology* 134, 1087–1092, Cambridge University Press. Acedido em 10 de Junho de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1017/S003118200700008X>.
- 38- Vercruysse, J., Behnke, J.M., Albonico, M., Ame, S.M., Angebault, C., Bethony, J.M., Engels, D., Guillard, B., Hoa, N.T.V., Kang, G., Kattula, D., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Mekonnen, Z., Montresor, A., Periago, M.V., Sumo, L., Tchuenté, L.A.T., Thach, D.T.C., Zeynudin, A., Levecke, B., (2011). Assessment of the Anthelmintic Efficacy of Albendazole in School Children in Seven Countries Where Soil-Transmitted Helminths Are Endemic. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(3), 948. Acedido em 15 de Junho de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000948>.

- 39- Caroccia G.H.G., Rodolpho J.A., Oliveira S.R.P., Camillo L., Magalhães L.G., Anibal F.F., (2013). Activity of the compounds curcumin and albendazole against the nematode *Toxocara canis* *in vitro*, *Revista Saúde* 7, (1-2). Acedido em 20 de Junho de 2017, em: <http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/view/1158>.
- 40- Bahmani M., Rafieian-Kopaei M., Hassanzadazar H., Saki K., Karamati S.A., Delfan B., (2014). A review on most important herbal and synthetic anthelmintic drugs, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Acedido em 25 de Junho de 2017, em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60200-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60200-5).
- 41- Oryan A., Alidadi S., (2015). Toxocariasis: A Neglected Parasitic Disease with Public Health Importance. *Tropical Medicine Surgery* 3, 126. Acedido em 29 de Junho de 2017, em: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-9088.1000126>.
- 42- Overgaaauw P.A.M., Van Knapen F., (2008). Toxocarosis, an important zoonosis, *European Journal of Companion Animal Practice* 18, 259–266;
- 43- Otero D., Alho A.M., Nijse R., Roelfsema J., Overgaaauw P., Carvalho, L.M., (2018). Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health* 11, 94–98.
- 44- Chung L.Y., Fang B.H., Chang J.H., Chye S.M., Yen C.M., (2004). The infectivity and antigenicity of *Toxocara canis* eggs can be retained after long-term preservation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98(3), 251-260;
- 45- Benex J., (1974). Diagnostic immunologique des parasitoses à protozoaires et helminthes. Ed. Maloine S.A., Paris. Chpa. I: 14-23.
- 46- Golvan Y.J., Ambroise-Thomas P. (Eds.) (1984). *Les nouvelles techniques en Parasitologie et Immuno-Parasitologie*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 298 pp.
- 47- Bradford M., (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

- 48- Ruitenberg E.J., Van Knapen F., (1977). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Its Application to Parasitic Infections, *The Journal of Infectious Diseases* 136, Supplement. *Enzymed-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) for Infectious Agents 267-273. Acedido em 12 de Dezembro de 2017, em: <https://www.jstor.org/stable/30107911?seq=1#>.
- 49- Kagan I.G., Norman L., (1963). Analysis of helminth antigens (*Echinococcus granulosus* and *Schistosoma mansoni*) by agar gel methods. *Annals of the New York Academy of Sciences* 113:130-153;
- 50- Rombert P.C., Trinca A., (1976). Imuno-electro-difusão – um método rápido para o diagnóstico do quisto hidático. Instituto de Higiene e Medicina Tropical VI (1/4): 63-70.
- 51- Voller A., Bidwell D.E., Bartlett, A., (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization* 53(1), 55-65.
- 52- Timmreck T.C., (1994). *An introduction to epidemiology* (1ª Ed.), Jones and Bartlett Publishers, Boston, London, Singapore, 477 pp.
- 53- Smith R.S., (1995). *Veterinary Clinical Epidemiology – A problem-oriented approach* (2ª Ed.), CRC press, London, 304 pp.
- 54- Akao N., Ohta N., (2007). Toxocariasis in Japan., 56, 87–93.
- 55- Gideon Informatics, I. & Berger, S., (2018). *Toxocariasis: Global Status: 2018 edition*, Gideon Informatics, Incorporated. Acedido em 1 de Março de 2018, em: <https://books.google.pt/books?id=FkVLDwAAQBAJ>.
- 56- Tavares L.P., Garrido J., Geraldés C.A., Tavares M.C., Faria A.C., (1998). Toxocaríase: contributo para o conhecimento epidemiológico no concelho da Feira. *Sociedade Portuguesa de Medicina Interna* 5(3), 152–157.;
- 57- David de Moraes J.A., Rombert P.C., Trinca A.C., (1990). Larva Migrante Visceral. Subsídios para o seu conhecimento epidemiológico no distrito de Évora. *Revista. Portuguesa de Doenças Infecciosas* 13(4), 227–234.

- 58- Pureza D.E.S.O., (2015). Prevalência, grau de contaminação e viabilidade de ovos de *Toxocara* spp. em parques públicos da área da Grande Lisboa. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Acedido em 5 de Março de 2018, em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/10506/1/Preval%C3%Aancia%2C%20Grau%20de%20Contamina%C3%A7%C3%A3o%20e%20Viabilidade%20de%20ovos%20de%20Toxocara%20spp.%20em%20Parques%20P%C3%BAblicos%20da%20C3%81rea%20da%20Grande%20Lisboa.pdf>;
- 59- Moreira G.M.S.G., Telmo P.L., Mendonça M., Moreira A.N., McBride A.J.A., Scaini C.J., Conceição F.R., (2014). Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions, 30(9).
- 60- Centers for Disease Control and Prevention, DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern, “Toxocariasis” (2013), *Global Health - Division of Parasitic Diseases and Malaria*. Acedido em 8 de Março de 2018, em: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxocariasis/dx.html>.
- 61- Wijesundera M.D.S., Iddawela D., Rajapakse R.P.V.J., (2003). Validation of a *Toxocara* ES antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (TES-ELISA) for use in childhood toxocariasis in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Medical Science* 46(2) 45–50.
- 62- Glickman L.T., Schantz P.M., Dombroske R., Cypess R., (1978). Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27:492-498.
- 63- Speiser F., Gottstein B., (1984). A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodignosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Tropica* 41:361-372.
- 64- Jacquier P., Gottstein B., Stingelin Y., Eckert J., (1991). Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1831-1835.
- 65- Niedfeld G.; Pezzani B.; Minvielle M., Basualdo Farjat J. A. (1993). Presence of lipids in the secretory/excretory product from *Toxocara canis*. *Veterinary Parasitology* 51: 155-158.

- 66- Ghosh A., Kar K., Ghosh D., Dey C., Misra K. K. (2010). Major lipid classes and their fatty acids in a parasitic nematode, *Ascaridia galli*. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology* 34(1), 52–56. Acedido em 9 de Março de 2018, em: <http://doi.org/10.1007/s12639-010-0005-4>.
- 67- Petry K., Nudelman E., Eisen H., Hakomori S.I., (1988). Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *Typanosoma cruzi* and mammalian tissues. *Molecular and biochemical parasitology* 30(2), 113-121.

ANEXOS

Anexo 1

Cultura *in vitro* de larvas L2 de *T. canis*

I. Obtenção e embrionamento de ovos de *T. canis* (adaptado de De Savigny, 1975)

Materiais

- Formalina 1%
- Soro fisiológico estéril
- Água destilada
- Hipoclorito de sódio
- Estéreo-microscópio
- Caixas de Petri de vidro
- Tubos de centrifuga de vidro
- Pipetas de Pasteur
- Pinça
- Bisturi
- Estufa

Método

1. Recolher os parasitas das fezes de cachorros previamente desparasitados com pamoato de pirantel (Strongid® Cães Pasta Oral, Pfizer Animal Health, USA), de acordo com a posologia recomendada. O princípio ativo deste anti-helmíntico, pamoato de pirantel, promove a paralisia do parasita e subsequente perda da capacidade de fixação ao lúmen intestinal, fazendo com que sejam eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro;
2. Separar os parasitas fêmea dos machos e lavar com soro fisiológico estéril, até não restar material fecal;
3. Dissecar as fêmeas ao estéreo-microscópio com o auxílio de um bisturi e pinça, fazendo um corte longitudinal a cerca de 2/3 da fêmea (local onde se encontra o útero), cuidadosamente para não cortar o intestino;
4. Retirar o útero bifurcado e exercer ligeira pressão com a pinça para libertação dos ovos.

5. Colocar os ovos recolhidos numa caixa de Petri com 16 cm de diâmetro, em 1% formalina até perfazer 3 mm da altura da caixa;
6. Incubar os ovos durante 40 dias, em estufa a 27°C, com agitação manual diária e eventual adição de meio sempre o volume de líquido se verificar ser inferior ao inicial, até o embrionamento total dos ovos;

II. Obtenção e cultura *in vitro* das larvas L2 de *T. canis* (adaptado de De Savigny, 1975)

Materiais

- Hipoclorito de sódio 1,5 M (NaOCl)
- H₂O estéril
- Solução de Eclosão → 1 volume da Solução A + 1 volume da Solução B + 100µl/ml Penicilina + 250µl/ml Estreptomicina
- Solução A → 0,1M NaHCO₃
- Solução B → 0,1M Na₂S₂O₅ + 0,25M NaCl + Tween 20 [25µl/L]
- HBSS (Hank's Balanced Salts Solution, Sigma-Aldrich, USA)
- Tubos de centrifuga de vidro
- Pipetas de Pasteur
- Frasco de sedimentação
- Lenços duplos finos de algodão (do tipo *Kleenex*®)
- Estufa

Método

1. Centrifugar várias vezes os ovos embrionados com água destilada a 200 rpm, durante 3 min, de forma a eliminar totalmente a formalina;
2. Desprezar o sobrenadante e ressuspender os ovos no dobro do volume em 1,5 M Hipoclorito de sódio (NaOCl);

3. Após confirmação microscópica da completa descorticação dos ovos, lavar a suspensão cerca de 10 vezes com H₂O esterilizada até que o cheiro a cloro desapareça;
4. Incubar os ovos descorticados na Solução de Eclosão durante 2 horas e 30 min, a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂;
5. Após confirmação da eclosão larvar ao microscópio, lavar duas vezes a suspensão de larvas L2 em HBSS com 100 µl/ml de Penicilina e 250 µg/ml de Estreptomicina;
6. Manter a suspensão durante a noite em HBBS, a 37°C e 5% de CO₂, numa adaptação do aparelho de *Baermann* - um frasco de sedimentação com uma camada de lenços duplos finos de algodão (do tipo *Kleenex*®), de forma a permitir a migração das larvas viáveis através do lenço;
7. Recuperar as larvas viáveis no fundo do frasco de sedimentação;
8. Transferir as larvas recuperadas para tubos de cultura, contendo meio HBSS (com Penicilina e Estreptomicina, como descrito anteriormente) e mantê-las a 37°C numa atmosfera de 5 % de CO₂, durante 7 dias;
9. Substituir periodicamente o meio de cultura e guardar o meio antigo a -20°C para avaliação antigénica;
10. Congelar as larvas a -20°C quando se verificar que a viabilidade das mesmas é nula ou praticamente nula;

Anexo 2

Obtenção do antígeno total e deslipidizado (AgDs) de larvas L2 de *T. canis*

I. Preparação de antígeno total

Materiais

- Solução salina de cloreto de sódio a 1%
- Pipetas de Pasteur
- Tubos de centrífuga
- Almofariz
- “Mixer” ou equivalente
- Sonicador MSE
- Centrífuga refrigerada
- Arca de congelação

Método

1. Colocar as larvas descongeladas num “mixer” ou equivalente e acrescentar cerca de 10 vezes o seu volume, com solução salina 1% estéril;
2. Proceder à fragmentação das larvas por meio de ultrassons num sonicador e proceder a sucessivos passos de congelação, descongelação e sonicação – estes passos têm a função de libertar os antígenos do interior das células;
4. Centrifugar (Spectronic 70, Bausch & Lomb) a 4°C durante 30 minutos a 8000 rpm em centrífuga refrigerada;
5. Retirar cuidadosamente o sobrenadante e guardar o sedimento a -20°C para a preparação de antígenos deslipidizados;
6. O sobrenadante assim obtido constitui o antígeno total ou bruto;

II. Preparação de antígeno deslipidizado

Materiais

- Solução salina de cloreto de sódio a 1%
- Álcool absoluto
- Éter etílico anidro

- Pipetas de Pasteur
- Tubos de centrífuga
- Dissecador
- Arca frigorífica
- Centrífuga refrigerada

Método

1. Submeter o sedimento obtido na preparação do antígeno total, a duas lavagens com álcool etílico absoluto e uma com éter etílico anidro congelados;
2. Colocar o sedimento numa placa de Petri adequada à quantidade obtida, e colocar num dissecador à 4°C até que a massa esteja completamente seca – cerca de 4 dias;
3. Pesar o resíduo obtido e colocar na proporção de 200 mg/ 10 ml de solução salina a 1% estéril e colocar a 4°C no frigorífico;
4. Agitar manualmente 3 vezes ao dia durante 3 dias;
5. Centrifugar a 4°C durante 45 minutos a 5000 rpm em centrífuga refrigerada;
6. Retirar cuidadosamente o sobrenadante;
7. O sobrenadante assim obtido constitui o antígeno deslipidizado;
8. Determinar a concentração de proteína e testar o antígeno.

Anexo 3

Determinação quantitativa de proteínas (Método Bio-Rad Protein Assay)

Materiais

- Reagente corante concentrado 5 vezes (Ácido fosfórico e metanol)
- Padrão de proteína
- Tubos de ensaio
- Micropipetas
- Espectrofotômetro
- Vórtex

Método (Macro método para 20 – 140µg ou 200 – 1400µg de proteína por ml)

1. Preparar várias diluições de proteína;
2. Colocar 0,1ml dos padrões e das amostras (previamente diluídas) em tubos de teste limpos e secos;
3. Colocar 0,1 ml do tampão da amostra no tubo de teste para o branco;
4. Juntar 5 µl do reagente corante diluído em cada tubo;
5. Agitar no vórtex (evitar a formação de espuma em excesso);
6. Esperar entre 5 a 60 minutos e fazer a leitura no espectrofotômetro a 595 nm após ter colocado o aparelho a zero com o branco;
7. Fazer a curva de calibração com as densidades óticas obtidas e as respectivas concentrações;
8. Fazer a leitura das amostras desconhecidas na curva padrão.

Reagentes (preparados segundo o protocolo do kit da Bio-Rad)

1. Diluir o reagente corante (previamente filtrado) na proporção de 1/5 em água desmineralizada;
2. Preparar a diluição seriada da proteína padrão;

Anexo 4

Técnica de Micro-ELISA

Materiais

- Microplacas de poliestireno
- Papel de alumínio
- Espectrofotômetro (Anthos 2020)
- Pipetas e micropipetas;

Preparação dos tampões

1. Tampão carbonato pH 9.6

NaHCO₃ (2,1 gr) 500 ml (água destilada) (pH 8.0)

NaCO₃ (2,65 gr) 500 ml (água destilada) (pH 11.2)

2. Soro fisiológico 9%

NaCl 9 gr

H₂O destilada 1000 ml (1 litro)

3. Tampão Fosfato 0,5 M pH 7.2

Na₂HPO₄ (anidro)..... 25,55 gr

Na₂HPO₄ (anidro)..... 9,65 gr

H₂O destilada..... 500 ml

4. Tampão PBS 0,01 M

Tampão fosfato 0,5 M..... 20 ml

Soro fisiológico q.s.p. 1000 ml

5. Tampão PBS com TWEEN (concentração: 0,05%)

Tampão PBS 0,01 M.....1000 ml

Tween.....0,5 ml

NOTA 1: Para cada litro de PBS, utiliza-se 0,5 ml de Tween

NOTA 2: 1 litro de PBS/Tween dá para 2 placas

6. Tampão substrato/citrato pH-5.5

Tampão PBS 0,1 M..... 400 ml
Tampão citrato..... 100 ml

6.1. Acertar pH com ácido cítrico

* Tampão PBS 0,1 M
Tampão fosfato 0,5 M..... 100 ml
Soro fisiológico..... 400 ml
* Tampão Citrato
Ácido cítrico 0,1 M.....4,2 gr
H₂O destilada..... 200 ml

7. Substrato Cromogénico

Ortofenildiamina.....9 mg
Tampão substrato.....25 ml
H₂O₂ 30 v/v.....25 µl

Método

1. Sensibilização das placas com o antígeno em estudo (5 µl AgDs)

Ag (reconstituído).....50 µl
Tampão PBS 0.01 M10 ml (por placa)

1.1. Ag + PBS → 100 µl/poço;

1.2. Colocar as placas na estufa a 37°C durante 30 min ou mantê-las à temperatura ambiente durante 3 horas;

1.3. Colocar as placas no frigorífico uma noite a 4°C.

2. Retirar as placas do frigorífico, eliminar o tampão e proceder às lavagens com PBS/Tween

2.1. Efetuar quatro lavagens sucessivas com PBS/Tween:

2.1.1. Aplicar 200 µl de PBS/Tween

2.1.2. Aguardar 5 minutos

- 2.1.3. Retirar o tampão, bater a placa sobre papel de filtro e reencher até à 4ª lavagem;
- 2.1.4. Bloquear as placas com albumina bovina a 2%;
- 2.1.5. Incubar 1 hora e 30 minutos à TA;
- 2.2. Efetuar quatro lavagens sucessivas com PBS/Tween.

3. Preparação da diluição dos soros

- 3.1. Soros em estudo: diluição de 1/200 (para IgG) e 1/100 (para IgG₄)
5 µl (soro).....1 ml (tampão PBS/Tween)
- 3.2. Proceder à pipetagem em duplicado do Branco, controlo positivo, controlo negativo e soros em estudo, nos poços da placa:
B (Branco)..... 100 µl (tampão PBS/Tween)
CP (Controlo Positivo).....100 µl
5 CN (Controlo Negativo).....100 µl
Soros em estudo.....100 µl
- 3.3. Cobrir as placas com alumínio, deixar 2 horas à TA e colocar uma noite a 4°C.

4. Efetuar lavagens como em 2.1

5. Preparação das imunoglobulinas nas diluições de 1:20.000 (imunoglobulina marcada com peroxidase IgG anti-humana) e 1:5000 (imunoglobulina marcada com peroxidase IgG₄ anti-humana)

- 5.1. Para a IgG:
3 µl..... 60 ml de PBS/Tween
5.1.1. Colocar 100 µl/poço e deixar 1 hora e 30 minutos à TA
- 5.2. Para a IgG₄:
5 µl..... 25 ml de PBS/Tween
5.2.1. Colocar 100 µl/poço e deixar 1 hora e 30 minutos à TA
5.2.2. Efetuar lavagens como em 2.1
11 µl ExtrAvidin..... 22 ml de PBS/Tween
5.2.2. Colocar 100 µl/poço e deixar 1 hora e 30 minutos à TA

6. Efetuar lavagens como em 2.1

7. Colocar 100 µl do substrato/poço. Cobrir a placa com papel de alumínio e deixar à TA, no escuro, durante 30 minutos.

8. Parar a reação com HCL 2N: 50 µl/poço

HCL 2N: HCl (37%)..... 19,6 ml

H₂O destilada q.s.p..... 100 ml

9. Efetuar leituras no espectrofotômetro a 492 nm